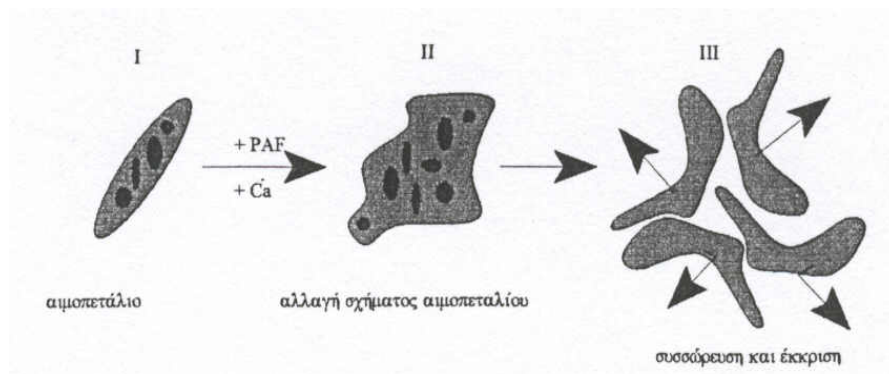


ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

«Light τρόφιμα: σύσταση λιποειδών και έλεγχος της βιολογικής δραστηρότητας αυτών. Σύγκριση με τα αντίστοιχα-πλήρη σε λιποειδή τρόφιμα»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΡΗΣΤΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΚΑΛΛΙΘΕΑ 2002

«Light τρόφιμα: Σύσταση λιποειδών και έλεγχος της βιολογικής δραστηρότητας αυτών. Σύγκριση με τα αντίστοιχα-πλήρη σε

Διπλωματική εργασία

Δήμητρα Χρήστου AM9801

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

Επίκουρος Καθηγήτρια

Επιστημονική Συνεργάτης

Γαλάνη Δέσποινα

Τριμελής Επιτροπή

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

Επίκουρος Καθηγήτρια

Δεδούσης Γιώργος

Λέκτορας

Κυριακού Αδαμαντίνη

Λέκτορας

ΚΑΛΛΙΘΕΑ 2002

Στους γονείς μου,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα Σμαραγδή Αντωνοπούλου για τη συνεχή υποστήριξη και καθοδήγησή της, καθώς και για τις εύστοχες διορθώσεις και παρατηρήσεις της, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Καταλυτική ήταν και η βοήθεια και υποστήριξη της κα Γαλάνη Δέσποινας, μέσα από τη συνεχή παρακολούθηση της και την επίλυση προβλημάτων και δυσκολιών, τόσο στο πειραματικό, όσο και στο βιβλιογραφικό κομμάτι της πτυχιακής. Στην ολοκλήρωση του εργαστηριακού μέρους συνέβαλε αποφασιστικά η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών με την άριστη συνεργασία και φιλοξενία της. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Μάγκο Φαίδωνα για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή του στην ολοκλήρωση του βιβλιογραφικού μέρους της εργασίας αυτής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Θέματα

Σελίδες

A. Εισαγωγή- Βιβλιογραφική ανασκόπηση	1-32
1. Βιολογικές δράσεις των λιποειδών που βρίσκονται στα τρόφιμα	1-4
2. PAF: Οι βιολογικές δράσεις του και η σημασία τους στην υγεία και την ασθένεια	4-14
α. Μεταβολισμός και τρόπος δράσης του PAF	4-9
β. Δράσεις του PAF	9-14
ι) Η επίδραση του PAF στη φλεγμονώδη αντίδραση	10-11
ii) Η επίδραση του PAF στο καρδιαγγειακό σύστημα	11-12
iii) Η επίδραση του PAF σε άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις	12-14
3. Αναστολείς του PAF	14-25
α. Συνθετικοί αναστολείς του PAF	15-19
β. Αναστολείς του PAF από φυσικές πηγές- Αντιθρομβωτικές ουσίες	19-25
4. Light τρόφιμα: Εφαρμογές και προβληματισμοί	25-32
α. Σκοπός της παραγωγής των light προϊόντων και κατά πόσο επιτυγχάνεται	25-29
β. Επίδραση της επεξεργασίας στην θρεπτική αξία των light προϊόντων	29-32
B. Πειραματικό Μέρος	32-104
1. Απομόνωση ολικών, πολικών και ουδέτερων λιποειδών	32-72
Α. Γάλα	32-41

	I. Γάλα πλήρες	32-36
	II. Γάλα ημίπαχο	37-41
	B. Γιαούρτι	42-49
	I. Γιαούρτι πλήρες	42-44
	II. Γιαούρτι ημίπαχο	44-49
	Γ. Μαργαρίνη	49-56
	I. Μαργαρίνη πλήρης	49-51
	II. Μαργαρίνη light	52-56
	Δ. Κασέρι	56-64
	I. Κασέρι πλήρες σε λιπαρά	56-59
	II. Κασέρι χαμηλό σε λιπαρά	59-64
64	E. Ζαμπόν	64-72
	I. Ζαμπόν πλήρες	64-67
	II. Ζαμπόν light	67-72
	2. Βιολογικό πείραμα	72-105
	A. Απομόνωση αιμοπεταλίων από κουνέλια	72-74
	B. Προετοιμασία δειγμάτων	74-75
	Γ. Βιολογικό πείραμα	75-78
	I. Όργανα	75
	II. Ρύθμιση της κλίμακας διαπερατότητας	75-76
76	III. Εύρεση της κατάλληλης συγκέντρωσης PAF	76-77
	IV. Τελική βιολογική δοκιμασία	77-78
	Δ. Αποτελέσματα	78-103
	I. Μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών	78-82
	II. Αποτελέσματα και συμπεράσματα για τα τρόφιμα	82-105
	1. Γάλα	82-85
	2. Γιαούρτι	86-89

3.Μαργαρίνη	89-94
4. Κασέρι	94-98
5. Ζαμπόν	98-105
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	 106-111
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	 I- IX

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.Βιολογικές δράσεις των λιποειδών που βρίσκονται στα τρόφιμα

Στα λιποειδή που βρίσκονται στα τρόφιμα, τα οποία καταναλώνει ο άνθρωπος ανήκει μεγάλη ποικιλία χημικών ενώσεων όπως τριγλυκερίδια (TG), φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, στερόλες και στερολικά παράγωγα, υδρογονάνθρακες μικρής και μακράς αλύσου και τα παράγωγά τους, ακετυλένια και θειοφαίνια, διάφοροι απλοί αλειφατικοί και λιποδιαλυτές βιταμίνες. Τα συστατικά αυτά είναι πιθανό να τροποποιηθούν κατά την αποθήκευση, επεξεργασία και προετοιμασία των τροφίμων καθώς και κατά τη διάρκεια της πέψης. Επομένως η μορφή και τα επίπεδα πρόσληψης κάθε ενός από αυτά εξαρτάται τόσο από τον τύπο της δίαιτας και την επιλογή των τροφών, όσο και από τη μέθοδο προετοιμασίας και επεξεργασίας τους. Στις αναπτυγμένες, δυτικές χώρες καθημερινά καταναλώνονται 100-200 γρ. λίπους στη δίαιτα, τα οποία συνεισφέρουν το 35-45% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης και από αυτό το 60-80% είναι ζωικής προέλευσης. Το σημαντικότερο τμήμα του λίπους στη δίαιτα αποτελείται από TG που ποικίλουν ανάλογα με το είδος και τη θέση των λιπαρών οξέων που εστεροποιούν τη γλυκερόλη. Αν και τα μη γλυκερινικά λιπίδια που περιέχονται στα τρόφιμα βρίσκονται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, εμφανίζουν ποικιλία πιθανών, σημαντικών βιολογικών δράσεων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι βιταμίνες E, A και D που είναι λιποειδικής φύσεως και διαθέτουν ποικιλία γνωστών επιδράσεων στον οργανισμό, όπως αντιοξειδωτική δράση, ρύθμιση μεταβολισμού των οστών.

Οι βασικότερες βιολογικές δράσεις των λιποειδών της δίαιτας αφορούν το κυτταρικό επίπεδο και αποτελούν τη βάση για τις ευρύτερες επιδράσεις του διαιτητικού λίπους στην υγεία του οργανισμού. Συνοπτικά θα αναφερθούν οι πιο σημαντικές και καλά μελετημένες.

Είναι γνωστό ότι τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται από το κύτταρο για παραγωγή ενέργειας μέσω της β- οξείδωσης και είναι είτε ενδογενούς προέλευσης, οπότε συντίθενται από τον οργανισμό από ακέτυλο- CoA ή προέρχονται από λιπόλυση των TG του λιπώδους ιστού, είτε είναι εξωγενούς προέλευσης και κυκλοφορούν στο αίμα σε μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα ή σε μέρος των λιποπρωτεϊνών. Είναι επίσης γνωστό ότι τα λιπαρά οξέα κατά την αποικοδόμησή τους προς παραγωγή ενέργειας παρέχουν στον οργανισμό 9Kcal/ γρ. καταναλισκόμενου λίπους και επομένως

αποτελούν μια πλούσια πηγή ενέργειας, που χρησιμοποιείται για να στηρίξει ενεργειακά τον οργανισμό σε καταστάσεις αστίας.

Τα λιπίδια έχουν σημαντικό ρόλο και στη δομή των βιολογικών κυτταρικών μεμβρανών και ενδεχομένως να επηρεάζουν με πολλούς τρόπους τη λειτουργία των μεμβρανικών και ενδοκυττάρων πρωτεϊνών. Οι φυσικές ιδιότητες των λιποειδών της μεμβράνης, και κυρίως των λιπαρών οξέων που συμμετέχουν στα φωσφολιπίδια της, καθορίζουν την ρευστότητα της μεμβράνης σε σύνολο. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των διπλών δεσμών των λιπαρών οξέων, η θέση τους στην αλυσίδα, το αν είναι *cis* ή *trans* καθώς και το μήκος της αλυσίδας παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δομική και λειτουργική διαμόρφωση των μεμβρανών. Έχει φανεί από έρευνες ότι αρκετά ένζυμα που είναι δεσμευμένα στις κυτταρικές μεμβράνες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα ως προς τα λιπαρά οξέα που τα περιβάλλουν. Τέτοια ένζυμα είναι η αδενυλική κυκλάση, η 5' νουκλεοτιδάση, η Na/K- ATPάση (1). Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για αρκετούς υποδοχείς όπως της ινσουλίνης, χωρίς να είναι ακόμα πλήρως διευκρινισμένος ο ρόλος των λιπαρών οξέων της μεμβράνης στη λειτουργία τους (2). Από αρκετές έρευνες έχει φανεί αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη σε διαβητικούς ασθενείς μετά από κατανάλωση ω-3 λιπαρών οξέων, αλλά τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση (1).

Τα λιπίδια των μεμβρανών συμμετέχουν άμεσα και στη μεταβίβαση μηνυμάτων, όπως για παράδειγμα η υδρόλυση ορισμένων φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, της φωσφατιδυλοχολίνης και της 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλinoσιτόλης από τις φωσφολιπάσες οδηγεί στη δημιουργία δευτερευόντων μηνυμάτων, όπως η διαγλυκερόλη (DAG). Άλλα φωσφολιπίδια συμμετέχουν στη σταθεροποίηση ή στην ενεργοποίηση ενζύμων που σχετίζονται με ενδοκυττάρια μηνύματα, όπως για παράδειγμα η φωσφατιδυλοσερίνη είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) (2, 3). Έχει πράγματι φανεί από έρευνες σε ζώα ότι η δραστηριότητα της PKC περιορίζεται σε περιβάλλον με φωσφολιπίδια πλούσια σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) (2).

Ένας άλλος τύπος φωσφολιπιδίου που βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες περιλαμβάνει την ένωση ενός λιπαρού οξέος στη θέση 1 της γλυκερόλης με αιθερικό δεσμό. Τέτοια φωσφολιπίδια είναι πρόδρομες ενώσεις του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), ένα πολύ ισχυρό προφλεγμονώδη παράγοντα και υπεύθυνο για την ενεργοποίηση πολλών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου και των αιμοπεταλίων. Ο PAF σχηματίζεται με την υδρόλυση του εστερικά συνδεδεμένου λιπαρού οξέος του

παραπάνω φωσφολιπιδίου από τη θέση 2 και την ακετυλίωση της παραπάνω θέσης. Έχει φανεί ότι ενσωμάτωση αραχιδονικού οξέος στη θέση αυτή ενισχύει τη δράση του PAF, ενώ τα ω-3 λιπαρά οξέα μειώνουν τη παραγωγή του από τα μονοκύτταρα(2). Σε έρευνα που μελέτησε την επίδραση της πρόσληψης δοκοσοεξανικού οξέος (DHA, ω-3) και εικοσατριενικού (ω-9) στην παραγωγή PAF σε κύτταρα του περιτοναίου από ποντικούς επιβεβαιώθηκε ότι και οι δύο τύπου δίαιτες περιορίζουν την παραγωγή PAF στον ίδιο περίπου βαθμό (4). Στην ίδια έρευνα όμως φάνηκε ότι η επίδραση της πρόσληψης των δύο οξέων στο περιεχόμενο των φωσφολιπιδίων σε αραχιδονικό οξύ και στην απελευθέρωση του τελευταίου ήταν διαφορετική, πιθανά λόγω του διαφορετικού τρόπου δράσης τους, που στην περίπτωση του DHA φαίνεται να είναι ο ανταγωνισμός με το αραχιδονικό οξύ για την ενσωμάτωσή τους στη θέση 2 των φωσφολιπιδίων (4).

Το αραχιδονικό και το εικοσαπεντανοϊκό οξύ είναι πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση των εικοσανοειδών που περιλαμβάνουν ενώσεις όπως θρομβοξάνες και προσταγλανδίνες, λευκοτριένια, λιποξίνες κα. Η σύνθεση των εικοσανοειδών επηρεάζεται και από τη διαθεσιμότητα των αντίστοιχων λιπαρών οξέων στη διαίτα και κατ' επέκταση στον οργανισμό ως εξής: Τα ω-3 λιπαρά οξέα, εικοσαπεντανοϊκό (EPA) και δοκοσαεξανικό (DHA), αναστέλλουν την οξυγόνωση του αραχιδονικού δεσμεύοντας ανταγωνιστικά το υπεύθυνο ένζυμο κυκλοοξυγονάση. Το EPA μπορεί να λειτουργήσει σαν υπόστρωμα και για το ένζυμο 5- λιποξυγονάση. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των εικοσανοειδών και ανάλογα με το υπόστρωμα που διαθέτουν κάθε φορά οδηγούν σε διαφορετική σειρά εικοσανοειδών. Επομένως, όταν από τη διαίτα λαμβάνεται υψηλή ποσότητα ω-3 λιπαρών οξέων, το αραχιδονικό οξύ των μεμβρανών μειώνεται και τα εικοσανοειδή που παράγονται από αυτό το ίδιο. Αντίθετα συντίθενται προσταγλανδίνες (PG) και θρομβοξάνες (TX) της σειράς 3 και λευκοτριένια (LT) της σειράς 5, τα οποία δεν έχουν τις ίδιες βιολογικές δράσεις με τα αντίστοιχα που παράγονται από το αραχιδονικό. Για παράδειγμα, η TXA3 είναι λιγότερο δραστική από την TXA2 στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στη σύσπαση των φλεβών και το LTB5 είναι λιγότερο δραστικό από το LTB4 ως προς τις χημειοτακτικές και συσσωρευτικές ιδιότητες των ανθρώπινων ουδετεροφίλων. Αντίθετα, η PGI3 είναι πιο δραστική από την PGI2 στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και στην προώθηση της αγγειοδιαστολής. Στη συνολική αντιθρομβωτική επίδραση των εικοσανοειδών αυτών είναι πιθανό να οφείλεται

Τα τελευταία χρόνια αυξανόμενο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει και μία άλλη κατηγορία λιποειδών από φυσικές πηγές και τρόφιμα με ιδιότητες να αναστέλλουν τη δράση του PAF. Η μελέτη και η σημασία τους θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω.

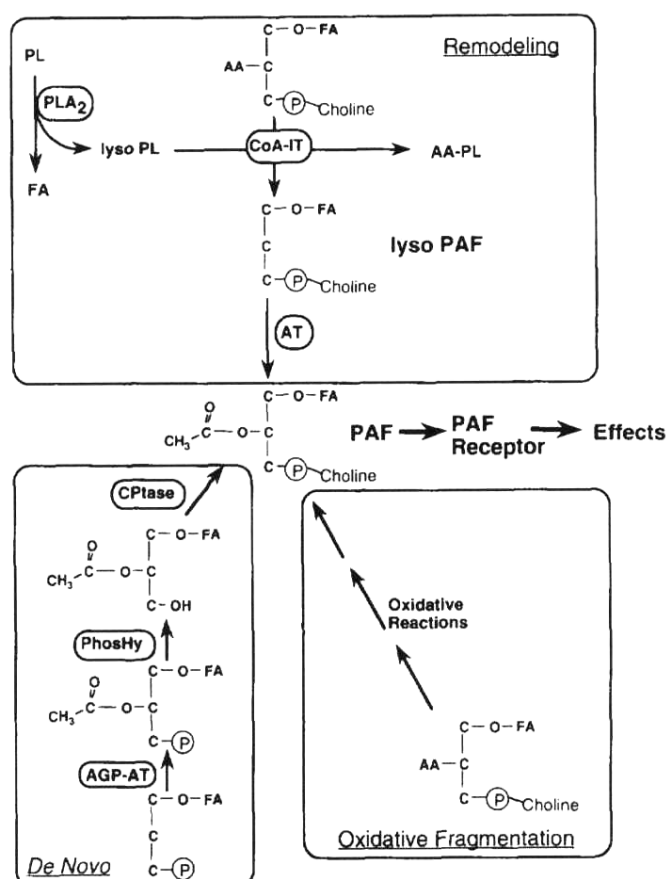
το όνομά του, αφού απελευθερωθεί από βασεόφιλα κύτταρα κουνελιού, μετά από ευαισθητοποίησή τους με IgE. Από την αναγνώρισή του στις αρχές της δεκαετίας του '70 μέχρι σήμερα, ένα τεράστιο εύρος βιολογικών δράσεων έχει αναγνωρισθεί με πολλές προεκτάσεις για το ρόλο που ενδεχομένως έχει ο PAF σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις (8-11)].

Μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων έχει φανεί ότι παράγουν PAF μετά από κατάλληλη ευαισθητοποίηση, όπως από τα κύτταρα που συμμετέχουν στην φλεγμονώδη αντίδραση (μονοκύτταρα/ μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, αιμοπετάλια), ανθρώπινα κύτταρα του ενδοθηλίου, κύτταρα του μυοκαρδίου(8, 10). Τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα φαίνεται ότι διαθέτουν και υποδοχείς του PAF, ενώ αποτελούν και κύτταρα στόχους της δράσης του. Εκτός από το συγκεκριμένο δραστικό φωσφολιπίδιο έχουν αναγνωρισθεί και άλλα φωσφολιπίδια με συγγενή δομή

που εμφανίζουν παρόμοιες βιολογικές δράσεις με τον PAF(8).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα δομικά ανάλογα του με διαφορετικού μήκους αλυσίδες αλκυλίων, όπως 15:0-, 16:0-PAF(8), καθώς και ορισμένα προϊόντα οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων φωσφολιπιδίων, που παρουσιάζουν δράση ανάλογη με αυτή του PAF και έχουν βρεθεί στην οξειδωμένη LDL, σε αθηρωματικές πλάκες, στο πλάσμα (12, 13).

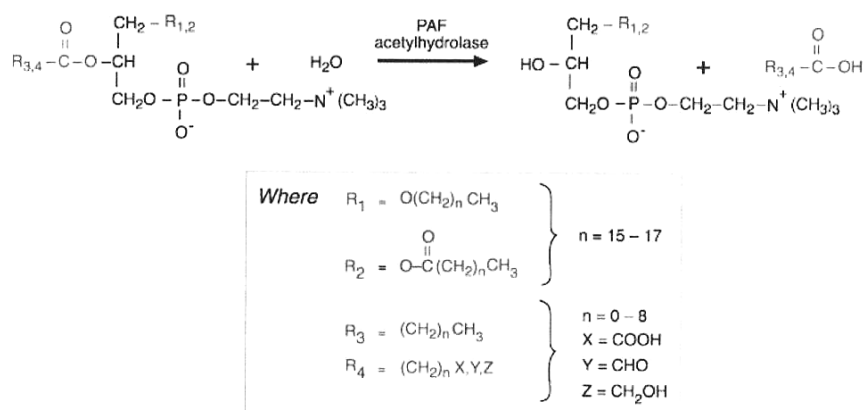
Η βιοσύνθεση του PAF και των ανάλογων με αυτών δραστικών λιπιδίων γίνεται με τρεις τρόπους κυρίως: τη de novo σύνθεση, την οξειδωτική κατάτμηση και την αναδόμηση που συνοψίζονται στο



Εικόνα 2: Βιοσύνθεση του PAF. Όπου FA: ακυλο-ομάδα λιπαρού οξέος, AA: αραχιδονικό οξύ, PLA2: φωσφολιπάση A2, CoA-IT: CoA-ανεξάρτητη τρανσακυλάση, AT: ακέτυλοτρανσφεράση, AGP-AT: ακέτυλοτρανσφεράση του 1-O-άλκυλο-sn-γλύκερο-3-φωσφορικό, Phosphorylase: φωσφουδρολάση του 1-O-άλκυλο-2-ακέτυλο-sn-γλύκερο-3-φωσφορικό, CPTase: γολινοφωσφοτρανσφεράση

εικόνα 2. Η πρώτη περιλαμβάνει ακετυλίωση, αποφωσφορυλίωση και μεταφορά χολίνης με τη συμμετοχή των 3 αντίστοιχων ενζύμων και φαίνεται να συμμετέχει στη παραγωγή του PAF υπό φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε ιστούς όπως των νεφρών και του κεντρικού νευρικού συστήματος(8, 10). Το μονοπάτι της αναδόμησης αποτελεί την πιο σημαντική οδό στην περίπτωση των κυττάρων της φλεγμονής. Αρχικά απομακρύνεται το αραχιδονικό οξύ από το φωσφολιπίδιο 1-0-ακυλο-2-αραχιδονυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη οπότε προκύπτει το μόριο λύσο-PAF. Στη συνέχεια με το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση σχηματίζεται ο PAF. Το στάδιο αυτό φαίνεται ότι εξαρτάται από την παρουσία κατιόντων ασβεστίου και πιθανόν να υπόκειται σε ορμονική ρύθμιση (10). Υπό οξειδωτικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση αφθονίας ελευθέρων ριζών, τα μόρια της 1-άκυλο-φωσφατιδυλοχολίνης που περιέχουν ακόρεστη άκυλο ομάδα στη θέση sn-2 είναι πιθανό να διασπαστούν σε διάφορα είδη 1-άκυλο- φωσφολιπιδίων με ποικιλία υποκατάστατων με κοντές αλυσίδες στη θέση sn-2. Το μονοπάτι αυτό της παραγωγής φωσφολιπιδίων με δράση ανάλογη του PAF δεν υπόκειται σε κάποιο ενζυματικό έλεγχο όπως τα δύο προηγούμενα, αλλά συμβαίνει ανεξέλεγκτα ανάλογα με την ύπαρξη οξειδωτικών παραγόντων. Τέτοιου είδους φωσφολιπίδια σχηματίζονται in vivo όπως φαίνεται από τη συσσώρευσή τους σε ιστούς καπνιστών, στην οξειδωμένη LDL (12), καθώς και σε ιστούς ποντικών μετά από έκθεσή τους σε καπνό για 15 λεπτά ως αποτέλεσμα του αυξημένου οξειδωτικού στρες (13).

Ο καταβολισμός και η απενεργοποίηση του PAF και των ανάλογων οξειδωμένων φωσφολιποειδών του γίνεται λίγα λεπτά μετά την παραγωγή τους, από εξειδικευμένα ένζυμα, τις ακετυλοϋδρολάσες, που αφαιρούν την ακυλο-ομάδα στη θέση sn-2, οπότε σχηματίζεται το ανενεργό μόριο λύσο-PAF (εικόνα 3). Το



Εικόνα 3: Ο καταβολισμός του PAF από τις ακετυλοϋδρολάσες

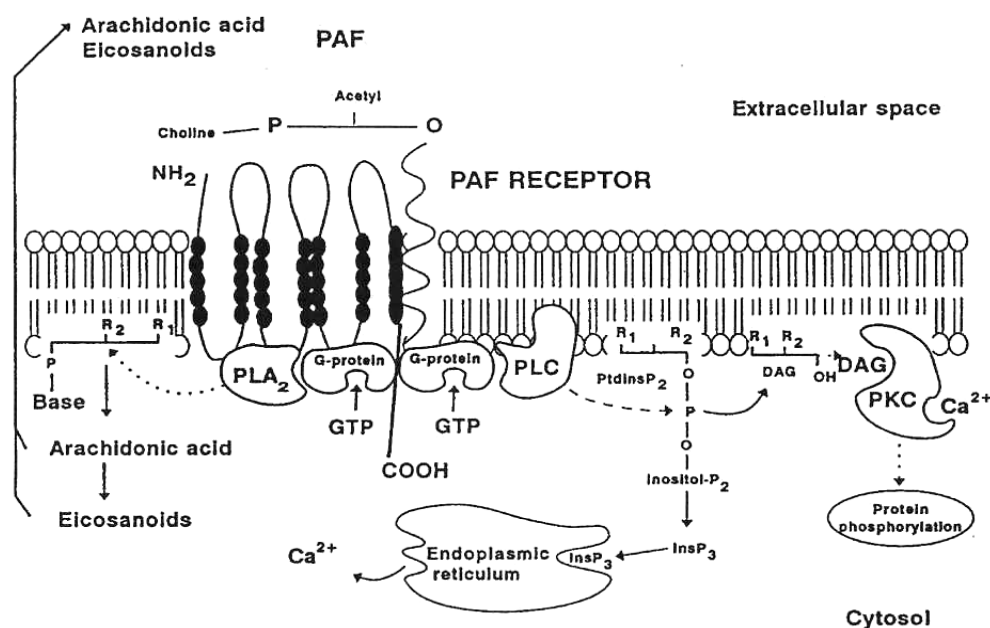
ένζυμο αυτό βρίσκεται στο πλάσμα και σε διάφορους ιστούς ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια, ενώ στο ανθρώπινο πλάσμα μεταφέρεται μαζί με τις λιποπρωτεΐνες LDL και HDL (8).

Ο βασικός ρόλος του PAF φαίνεται να είναι η μεσολάβηση για την επικοινωνία και την αλληλεπίδραση διαφόρων κυττάρων. Μετά την παραγωγή του από ποικιλία κυττάρων συνδέεται με υποδοχείς του στις κυτταρικές μεμβράνες άλλων κυττάρων τα οποία ενεργοποιεί και τροποποιεί ανάλογα. Εκτός από αυτή τη διακυτταρική αλληλεπίδραση, ο PAF πιστεύεται ότι επιδρά τόσο αυτοκρινικά στο ίδιο το κύτταρο που τον παράγει, όσο και ενδοκρινικά μέσω ενός ή περισσότερων ενδοκυτταρικών υποδοχέων(9). Ο τελευταίος τρόπος δράσης του PAF είναι ο λιγότερο μελετημένος, αν και πρόσφατα έχει βρεθεί ότι υποδοχέας του PAF στα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζεται όχι μόνο στην επιφάνειά τους αλλά και ενδοκυττάρια(8). Η διακυτταρική μεταβίβαση μηνυμάτων μέσω του PAF ρυθμίζεται από πολλούς μηχανισμούς όπως η αυστηρά ελεγχόμενη σύνθεσή του (εκτός από την περίπτωση της οξειδωτικής κατάπτωσης), η συγκεκριμένη κυτταρική έκφραση του υποδοχέα του, η απευαισθητοποίησή του υποδοχέα του και η ταχύτατη αποδόμησή του από τις ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια ακετυλοϋδρολάσες (9).

Οι διακυτταρικές δράσεις του PAF εξαρτώνται άμεσα από τη σύνδεσή του με εξειδικευμένο υποδοχέα συνδεδεμένο με μια G- πρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια ποικιλίας κυττάρων, όπως τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα λευκοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα κύτταρα Kupffer, τα επιθηλιακά κύτταρα του βρόγχου και της τραχείας, ενώ ενδείξεις της έκφρασης του υποδοχέα υπάρχουν και για άλλους ιστούς όπως των πνευμόνων, του ήπατος, των νεφρών, του εγκεφάλου, της σπλήνας, του ειλεού διαφόρων ζώων(11). Στον άνθρωπο εκτός από τα κύτταρα της φλεγμονώδους αντίδρασης m-RNA για την έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα φαίνεται ότι εμφανίζουν ιστοί όπως ο πλακούντας, ο πνεύμονας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα φλεβών, αλλά όχι η καρδιά, το πάγκρεας, ο εγκέφαλος, το ήπαρ, ο σκελετικός μυς, τα νεφρά και το πάγκρεας. Η ευαισθησία της μεθόδου αυτής όμως τίθεται υπό αμφισβήτηση (11). Επίσης, το γονίδιο για τον υποδοχέα του PAF έχει ταυτοποιηθεί και κλωνοποιηθεί και στα κύτταρα του μυοκαρδίου, ενώ από μελέτες έχει φανεί ότι ο αποκλεισμός των υποδοχέων αυτών αναστέλλει και τις μηχανικές και τις βιοχημικές δράσεις του PAF στο μυοκάρδιο. Επομένως η παρουσία υποδοχέων του PAF στα κύτταρα του μυοκαρδίου είναι πιθανή (8).

Ο υποδοχέας του PAF στον άνθρωπο έχει βρεθεί ότι είναι ένα πολυπεπτίδιο αποτελούμενο από 342 αμινοξέα, ενώ έχουν αναγνωρισθεί και οι διάφορες ειδικές θέσεις του υποδοχέα. Η πλήρη έκφραση της βιολογικής δραστηριότητας του PAF

προϋποθέτει την ύπαρξη αιθερικού δεσμού στη θέση sn-1 της γλυκερόλης, μια μικρή ακυλο- αλυσίδα, συνήθως ακέτυλο-αλυσίδα, στη θέση sn-2 και πολική κεφαλή χολίνης ή αιθανολαμίνης στη θέση sn-3. Το μήκος της αλκυλο- αλυσίδας στη θέση sn-1 και ο αριθμός των διπλών δεσμών δεν επιδρούν σημαντικά στη βιολογική δραστηριότητα του μορίου. Αντίθετα, η παρουσία εστερικού δεσμού στη θέση sn-1 ή ακυλο-αλυσίδα με 3 ή περισσότερους άνθρακες στη θέση sn-2 μειώνει σημαντικά και τροποποιεί τις βιολογικές ιδιότητες του μορίου(8). Έχει γίνει η υπόθεση ότι ο PAF δεσμεύεται στον υποδοχέα και ενεργοποιεί τη συνδεδεμένη G- πρωτεΐνη, ανταλλάσσοντας την τριφωσφορική γουανωσίνη με διφωσφορική. Στη συνέχεια η G-πρωτεΐνη ενεργοποιεί μια φωσφολιπάση C (PLC) ειδική στη φωσφατιδυλinoσιτόλη. Επομένως, η ενεργοποίηση του υποδοχέα του PAF οδηγεί στην παραγωγή διακυλογλυκερόλης (DAG), η οποία ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), και στην παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP₃), η οποία μεσολαβεί για την απελευθέρωση του αποθηκευμένου ασβεστίου (8, 11) (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού της μεταβίβασης του σήματος από τον υποδοχέα του PAF. Όπου PLA₂: φωσφολιπάση A₂, G protein: πρωτεΐνη που δεσμεύει GTP, PtdInsP₂: 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλinoσιτόλη, inositol-P₂: 4,5-διφωσφορική ινοσιτόλη, InsP₃: 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη, DAG: διακυλογλυκερόλη, PKC: πρωτεϊνική κινάση C.

Τα βασικά βήματα αυτής της οδού φαίνεται ότι λειτουργούν σε όλα τα κύτταρα που έχουν υποδοχείς του PAF και ότι οι διαφορές ως προς τις αντιδράσεις στον PAF οφείλονται στη διαφορετική λειτουργία των κυττάρων στόχων(8). Επίσης ο PAF έχει

βρεθεί ότι ενεργοποιεί την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και εικοσανοειδών από διάφορα κύτταρα με ποικίλους μηχανισμούς. Σε έρευνα που μελέτησε την επίδραση του PAF στη σύνθεση εικοσανοειδών από ενδοθηλιακά κύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα και μακροφάγα μετά από ενεργοποίησή τους με κατάλληλους αγωνιστές, φάνηκε ότι ο σχηματισμός του PAF από τα παραπάνω κύτταρα προηγούταν ή συνόδευε την παραγωγή εικοσανοειδών σε κάθε περίπτωση (14). Στην ίδια μελέτη η παραγωγή προστακυκλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από επίδραση βραδυκινίνης μειώθηκε σημαντικά από τους ανταγωνιστές του υποδοχέα του PAF WEB2086 ή CV6209. Οι ανταγωνιστές αυτοί ανέστειλαν την παραγωγή προστακυκλίνης από ενεργοποιημένα μακροφάγα γουρουνιού σε *in vitro* μελέτη και την παραγωγή λευκοτριενίου B4 από απομονωμένα πολυμορφοπύρρηνα κουνελιού(14). Ο υποδοχέας του PAF απευαισθητοποιείται λίγο μετά την ενεργοποίησή του με φωσφορυλίωση που πιθανά να τροποποιεί τη σύνδεση των G-πρωτεϊνών στους υποδοχείς. Έχει επίσης βρεθεί ότι υπάρχουν εννιά πιθανά σημεία φωσφορυλίωσης στο καρβοξυλικό άκρο του υποδοχέα, που πιθανά να είναι υπεύθυνα για την ταχύτατη απευαισθητοποίησή του (8). Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα είναι πιθανό να συμβαίνει με πολλούς τρόπους, όπως με τη δράση ειδικής κινάσης συνδεδεμένης με την G-πρωτεΐνη ή με την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) που ενεργοποιείται από τον PAF (9).

Ενδιαφέρουσα είναι η διαπίστωση ότι πιθανά να υπάρχουν και άλλοι υποδοχείς στα αιμοπετάλια του ανθρώπου, που ενεργοποιούν την συσώρευσή τους, όταν συνδεθούν με μια σειρά λιπιδίων του φωσφορικού οξέος, όπως 1-O-αλκυλο-2-λυσο-γλυκεροφωσφορικό οξύ, 1-O-άκυλο-2-λυσο-γλυκεροφωσφορικό οξύ, φωσφορικό οξύ της σφίγγοςίνης και διάφορα ομόλογα και ανάλογά τους. Η επίδρασή τους στα αιμοπετάλια εξακολούθησε να υφίσταται ακόμα και μετά την απευαισθητοποίηση του υποδοχέα του PAF υποδεικνύοντας, ότι υπάρχει κάποιος άλλος υποδοχέας που φαίνεται ότι δεν απαιτεί στερεοχημική ειδίκευση, αλλά μια μακριά αλυσίδα υδρογονάνθρακα δεσμευμένη με φωσφορικό οξύ (15).

β. Δράσεις του PAF

Τα τελευταία χρόνια πολλές έρευνες έχουν ασχοληθεί με την εξακρίβωση των δράσεων του PAF στη λειτουργία των ποικίλων κυττάρων, οργάνων και συστημάτων τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων του PAF έχει προκαλέσει ποικίλες αντιδράσεις και αποτελέσματα

ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, τη συγκέντρωση του PAF και τη συνεργασία με άλλους διακυτταρικούς ή ενδοκυττάρους μεσολαβητές.

i) Επίδραση του PAF στη φλεγμονώδη αντίδραση

Στη φλεγμονώδη αντίδραση ο PAF έχει καλά εξακριβωμένη δράση και φαίνεται ότι μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων της φλεγμονής (λευκοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα κα) σε χρόνιες ή οξείες καταστάσεις σε όλα τα όργανα. Σε αυτή την περίπτωση ο PAF δρα παρακρινικά σε μικρές αποστάσεις κυκλοφορώντας στο πλάσμα μέχρι να καταβολιστεί από την ακετυλοϋδρολάση. Φαίνεται όμως ότι στις περισσότερες περιπτώσεις ο PAF αναγνωρίζεται και δεσμεύεται από τον υποδοχέα του στα κύτταρα στόχους, ενώ βρίσκεται συνδεδεμένος με την μεμβράνη του κυττάρου που τον παράγει και δρα συνεργιστικά με την πρωτεΐνη P-σελεκτίνη στην ενεργοποίηση των κυττάρων στόχων (9). Φαίνεται ότι από τα βασικότερα κύτταρα που παράγουν τον PAF στη φλεγμονώδη απάντηση μετά από ενεργοποίηση τους με θρομβίνη ή άλλο μεσολαβητή της φλεγμονής είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια. Στη συνέχεια μέσω της δράσης του PAF τα κύτταρα αυτά αλληλεπιδρούν είτε μεταξύ τους, είτε με άλλα κύτταρα όπως τα πολυμορφοπύρρηνα και τα μονοκύτταρα που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση. Τα κύτταρα αυτά μετά την επίδραση του PAF υφίστανται αλλαγές σημαντικές για την εμφάνιση φλεγμονής όπως πόλωση, αυξημένη κινητικότητα, αυξημένη απελευθέρωση ενζύμων, κυττοκινών, δραστικών ριζών οξυγόνου (16), αναδιάταξη των επιφανειακών δομών τους, αλλαγές στην έκφραση ορισμένων γονιδίων τους(9), παραγωγή εικοσανοειδών (14), αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου(8). Σε έρευνα που μελέτησε την επίδραση της χορήγησης υδροχλωρικού οξέος σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια ενδοτραχειακά στην εμφάνιση φλεγμονής στους πνεύμονες, τα ποντίκια που είχαν υπερβολικά αυξημένη την έκφραση του υποδοχέα (PAFR-TG) εμφάνισαν σοβαρότερη πνευμονική φλεγμονή σε σχέση με τα κανονικά μη μεταλλαγμένα ποντίκια (WT). Αντίθετα, τα συμπτώματα των ποντικών που είχαν ελλιπή έκφραση του υποδοχέα (PAFR-KO) ήταν κατά πολύ ηπιότερα σε σχέση με αυτά των WT (11). Επίσης σε αρκετές κλινικές δοκιμές και πειράματα σε ζώα έχει φανεί η ανασταλτική δράση διαφόρων ανταγωνιστών του PAF στην εμφάνιση ή στην επιδείνωση φλεγμονωδών καταστάσεων όπως το σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (SIRS)(11, 17), η οξεία παγκρεατίτιδα (18-20)], η δραστηριότητα των ουδετερόφιλων σε ευαισθητοποιημένα ποντίκια (21).

ii) Επίδραση του PAF στο καρδιαγγειακό σύστημα

Στο καρδιαγγειακό σύστημα ο PAF είναι πιθανό να παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση, αφού έχει ιδιότητες αγγειογένεσης και δρα ενισχύοντας την επίδραση συγκεκριμένων πολυπεπτιδικών μεσολαβητών (8). Επίσης είναι πιθανό να επιδρά και στη φυσιολογική ρύθμιση της πίεσης του αίματος κυρίως επηρεάζοντας την νεφρική αγγειακή κυκλοφορία (8). Φαίνεται πως μεσολαβεί στην υπόταση και στις καρδιακές δυσλειτουργίες, που εμφανίζονται στην καρδιακή αναφυλαξία και σε πολλές καταστάσεις καρδιαγγειακού στρες όπως το σηπτικό, αιμορραγικό και τραυματικό σοκ (8, 10). Επιπλέον ο PAF συμμετέχει στην ενίσχυση της διαπερατότητας των ενδοθηλιακών αγγείων και στη ρύθμιση του τόνου των μακρο- και μικρο- αγγείων. Στις περισσότερες περιπτώσεις έχει καταγραφεί αγγειοσυστολή των μικρών αλλά και μεγάλων αγγείων μετά από επίδραση του PAF που φαίνεται ότι οφείλεται στην επίδρασή του στον υποδοχέα του, αλλά και στην παραγωγή της θρομβοξάνης A₂ και των λευκοτριενίων που ενισχύει. Σε περιορισμένες μόνο περιπτώσεις ο PAF προκάλεσε αγγειοδιαστολή πριν την αγγειοσυστολή όταν η δόση του ήταν πολύ μικρή, ενώ υπάρχει και η υπόθεση ότι ο PAF προκαλεί αγγειοσυστολή όταν το ενδοθήλιο είναι τραυματισμένο όπως μετά την ισχαιμία, ενώ προκαλεί αγγειοδιαστολή όταν το ενδοθήλιο είναι ανέπαφο (8, 10). Η εύρεση υψηλών τιμών του PAF σε πολύπλοκες αθηρωματικές πλάκες, όπου η νεοαγγειογένεση φαίνεται να εμπλέκεται στη δημιουργία των γραμμώσεων και η φλεγμονώδης αντίδραση στην αθηρογένεση, αποτελεί ένδειξη της πιθανής συμμετοχής του PAF στην αθηρογένεση και στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης (8). Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από μελέτες που δείχνουν τη μείωση της εστεροποιημένης χοληστερόλης στο αορτικό τοίχωμα κουνελιών μετά από χορήγηση ανταγωνιστών του PAF, την μερική τουλάχιστον μεσολάβηση του PAF στην αύξηση της εισόδου των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο που προκαλεί η οξειδωμένη LDL, η πιθανή οξείδωση της LDL μετά από ενεργοποίηση των μονοκυττάρων/μακροφάγων, λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων να παράγουν ανιόντα του υπεροξειδίου (14, 16). Τέλος η ανεξέλεγκτη δημιουργία *in vivo* οξειδωμένων φωσφολιπιδίων στην LDL με βιολογική δράση παρόμοια με αυτή του PAF αποτελεί μία επιπλέον ένδειξη για το σημαντικό ρόλο του μορίου αυτού στην αθηρογένεση (12, 13). Η εύρεση ότι η καρδιά του ανθρώπου πιθανότατα μπορεί να παράγει PAF, να εκφράζει τον υποδοχέα του και να είναι ευαίσθητη στην αρνητική ινотρόπο δράση του υποδεικνύει ότι το μόριο αυτό ίσως

έχει κάποιο ρόλο στην τοπική αντίδραση της του τραυματισμού του μυοκαρδίου (8). Πράγματι ισχυροποιείται η πεποίθηση ότι ο PAF μέσω της έμμεσης και άμεσης αρνητικής ινοτρόπου δράσης του στην καρδιά συνεισφέρει στη συνολική καρδιακή δυσλειτουργία, όπως στις περιπτώσεις της σηψαιμίας, του εμφράγματος του μυοκαρδίου, της καρδιακής αναφυλαξίας και άλλων, οπότε τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια και άλλα κύτταρα της φλεγμονής μπορεί να αυξάνουν την απελευθέρωση του PAF σε ποσότητες ικανές να βλάψουν περαιτέρω την καρδιακή λειτουργία (10). Η χορήγηση του αναστολέα UK74505 σε ποντικούς μετά από έντονη ισχαιμία της άνω μεσεντέριας αρτηρίας περιόρισε την τοπική συσσώρευση των ουδετερόφιλων, την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, την εντερική αιμορραγία, την ουδετεροπενία και την υπόταση, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή του PAF στις αντιδράσεις αυτές του καρδιαγγειακού συστήματος σε περίπτωση ισχαιμίας (22). Τέλος ο PAF φαίνεται να επηρεάζει το σύστημα αγωγής των καρδιακών παλμών και να προκαλεί θανατηφόρες αρρυθμίες σε πολλά ζώα, κυρίως μέσω της παραγωγής εικοσανοειδών. Οι ανταγωνιστές του PAF έχει φανεί ότι περιορίζουν τις αρρυθμίες που προκαλούνται μετά από την επίδρασή του, αλλά και στις περιπτώσεις των παθολογικών καταστάσεων της καρδιάς, στην παθοφυσιολογία των οποίων ενδέχεται να συμμετέχει (10).

iii) Η επίδραση του PAF σε άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις

Σημαντική φαίνεται να είναι η συμμετοχή του PAF στην εμφάνιση διαφόρων αλλεργικών αντιδράσεων του οργανισμού. Πολλά από τα συμπτώματα της αναφυλαξίας (ταχύτατη, συχνά θανάσιμη αλλεργική αντίδραση τύπου I που χαρακτηρίζεται από αλλαγή καρδιακού ρυθμού, υπόταση, αγγειακή διαρροή, σύσπαση αεροφόρων οδών) μπορούν να προκληθούν μετά από ένεση του PAF σε ζώα. Σε έρευνα που έγινε με μεταλλαγμένα ποντίκια ως προς τον υποδοχέα του PAF (PAFR-KO), φάνηκε ότι τα ποντίκια με μειωμένη την έκφραση του υποδοχέα εμφάνισαν δραστικά μειωμένες αντιδράσεις αναφυλαξίας μετά από ευαισθητοποίηση και είχαν αυξημένες πιθανότητες επιβίωσης σε σχέση με τα μη μεταλλαγμένα ποντίκια (11). Ο PAF παράγεται από ποικιλία κυττάρων που συμμετέχουν στο άσθμα όπως μακροφάγα, ουδετερόφιλα, μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα, τα οποία συγχρόνως ενεργοποιούνται από τον PAF. Επίσης, ο PAF προκαλεί σύσπαση των βρόγχων, υπερευαισθησία των αεροφόρων οδών, υπερέκκριση βλέννας, φαινόμενα που συμμετέχουν στην κρίση άσθματος. Μεταλλαγμένα ποντίκια με αυξημένη ευαισθησία

του υποδοχέα του PAF (PAFR-Tg) εμφάνισαν αυξημένη συστολή των βρόγχων σε σχέση με τα μη μεταλλαγμένα (WT) (11).

Πιθανή είναι η συμμετοχή του PAF και σε φλεγμονώδεις νόσους του δέρματος όπως η δερματίτιδα και η ψωρίαση(11). Σε έρευνα που μελέτησε την επίδραση του Y-24180, ανταγωνιστή του PAF, στις αλλεργικές δερματικές αντιδράσεις ποντικών μετά από κατάλληλη ευαισθητοποίηση, φάνηκε πράγματι αναστολή της άμεσης και καθυστερημένης φάσης της αλλεργικής αντίδρασης καθώς και ισχυρές ανασταλτικές επιδράσεις όταν συνδυαζόταν με τη δράση της τοπικής κορτιζόλης (23). Τα κύτταρα της κερατινοειδούς στοιβάδας και της επιδερμίδας στον άνθρωπο έχει βρεθεί ότι εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς του PAF. Στα PAFR-Tg ποντίκια εμφανίστηκαν μελανοκυτταρικοί όγκοι στο δέρμα αυθόρμητα. Στο δέρμα του αυτιού και της ουράς τα μελανοκύτταρα και τα κύτταρα της κερατινοειδούς στιβάδας πολλαπλασιάζονταν ταχύτατα. Το φαινόμενο αυτό πιθανά να εξηγείται ως εξής: η υπερβολική έκφραση του υποδοχέα του PAF στα κύτταρα του κερατινοειδούς μπορεί να οδήγησε σε ανώμαλη παραγωγή διαφόρων αυξητικών παραγόντων που στη συνέχεια οδήγησαν στην υπερπλασία των μελανοκυττάρων. Αντίθετα τα PAFR-KO ποντίκια δεν εμφάνισαν καμία ανωμαλία στο δέρμα τους (11).

Ο PAF φαίνεται ότι συμμετέχει και στην εμφάνιση ενδοτοξικού σοκ (μόλυνση από gram- βακτήριο) με συμπτώματα σηπτικού σοκ όπως η υπόταση, ενδαγγειακή πήξη του αίματος, πολλαπλή ανεπάρκεια οργάνων, θάνατο, που προκαλούνται πιθανότατα από τη δράση της ενδοτοξίνης στα μακροφάγα/ μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και ουδετερόφιλα, οπότε απελευθερώνονται παθογόνοι μεσολαβητές όπως ο PAF και διάφορες κυτοκίνες (11). Ο PAF θεωρείται πιθανός συνεργιστικός παράγοντας στην εκδήλωση σήψης και οργανικής ανεπάρκειας. Σε διπλά τυφλή έρευνα που έγινε σε ασθενείς με σηπτικό σοκ και SIRS φάνηκε ότι η χορήγηση του TV-309, ενός ανταγωνιστή του PAF αν και δεν άλλαξε τη συνολική θνησιμότητα από το σηπτικό σοκ προκάλεσε σημαντική μείωση της δυσλειτουργίας των οργάνων και της νοσηρότητας, που είναι ιδιαίτερα συχνά στο σηπτικό σοκ, χωρίς σοβαρές παρενέργειες, υποδεικνύοντας την πιθανή συμμετοχή του PAF στην ενίσχυση των συμπτωμάτων της σήψης (17). Τέλος το αν ο PAF συμμετέχει στην παραγωγή των διάφορων παθογόνων κυτοκινών που εμπλέκονται στην εμφάνιση της σήψης και σε πολλές άλλες παθολογικές καταστάσεις παραμένει υπό αμφισβήτηση. Σε έρευνα που μελέτησε την επίδραση του PAF στην έκκριση του ιστικού παράγοντα (TF) από τα ουδετερόφιλα, χορηγήθηκε ενδοφλέβια ανταγωνιστής του PAF (SM-12502,

200mg/Kg) σε ασθενείς με οξεία αποφρακτική χολαγγειίτιδα 5 λεπτά πριν την έναρξη της σήψης. Πράγματι, η έκφραση του ιστικού παράγοντα από τα ουδετερόφιλα μειώθηκε σημαντικά (24).

Υπό διερεύνηση είναι και ο ρόλος του PAF στη διαδικασία της αναπαραγωγής.

m-RNA για τον υποδοχέα του PAF ανιχνεύθηκε στο ενδομήτριο του ανθρώπου και τα επίπεδά του εμφανίζουν κυκλικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του γυναικείου κύκλου, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση του υποδοχέα του PAF ρυθμίζεται από τα στεροειδή του φύλου. Πολλές πιθανές ζωτικές δράσεις του PAF έχουν αναφερθεί όπως η εμφύτευση του εμβρύου, η ωρίμανση του ενδομητρίου μέσω των αγγειογενετικών ιδιοτήτων του PAF, η σύσπαση της μήτρας κατά τον τοκετό, η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, η ωρίμανση των πνευμόνων του εμβρύου. Τα ποντίκια PAFR-KO παραδόξως διέθεταν φυσιολογική δυνατότητα αναπαραγωγής, ενώ υπερβολική έκφραση του υποδοχέα εύκολα προκάλεσε ανωμαλίες στη γονιμοποίηση (11). Είναι σαφές ότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση στον τομέα αυτό.

3. Αναστολείς του PAF

Η συμμετοχή του PAF σε μεγάλο αριθμό παθολογικών λειτουργιών του οργανισμού οδήγησε στην διερεύνηση μεθόδων για αναστολή της δράσης του ή της παραγωγής του, με σκοπό την βελτίωση της πορείας διαφόρων ασθενειών στις οποίες φαίνεται ότι συμμετέχει, καθώς και την αποφυγή της εμφάνισής τους. Προς αυτή την κατεύθυνση στοχεύουν τρεις κατηγορίες παραγόντων με φαρμακευτικές προεκτάσεις: Οι αναστολείς της φωσφορικής λιπάσης A (PLA₂) που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των εικοσανοειδών και του PAF, η εξωγενής χορήγηση της ακετυλοϋδρολάσης, με σκοπό την ταχύτερη αποικοδόμηση του PAF και οι ανταγωνιστές του PAF, που είναι δομικά ή μη ανάλογα τα οποία αναστέλλουν ανταγωνιστικά τη σύνδεση του PAF με τον υποδοχέα του, αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση του. Ορισμένοι από αυτούς επιδρούν ταυτόχρονα και στην δράση ή παραγωγή της ακετυλοϋδρολάσης (16). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν οι ανταγωνιστές του PAF, αφού οι περισσότεροι από αυτούς έχουν φανεί αποτελεσματικοί σε αρκετά μοντέλα ζώων και ορισμένοι έχουν περάσει με επιτυχία από τεστ αποτελεσματικότητας και ασφάλειας και στον άνθρωπο. Οι κλινικές δοκιμές που έχουν γίνει όμως είναι ελάχιστες και δεν υπάρχουν ακόμα σαφή αποτελέσματα

για την ευρύτερη εφαρμογή τους. Πάντως οι επιδράσεις τους σε μοντέλα ζώων δικαιολογούν και επιβάλλουν την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασή τους στον άνθρωπο καθώς και την αναζήτηση νέων πιθανών αναστολέων και ανταγωνιστών της δράσης του PAF. Οι ανταγωνιστές του PAF χωρίζονται σε αυτούς που έχουν συντεθεί από τον άνθρωπο με σκοπό τον ανταγωνισμό της δράσης του PAF και είναι δομικά ή μη ανάλογά του και σε εκείνους που έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές. Η φαρμακευτική χρήση ανταγωνιστών του PAF στηρίζεται στη δέσμευσή τους στον υποδοχέα του και στην αναστολή της σύνδεσης του PAF με αυτόν, χωρίς όμως να προκαλούν ανάλογη βιολογική δράση.

α. Συνθετικοί αναστολείς του PAF

Πρόκειται για δομικά ή μη ανάλογα του PAF που φαίνεται ότι αναστέλλουν τη δράση του κυρίως μέσω της σύνδεσής τους με τον υποδοχέα του. Οι περισσότεροι έχουν δοκιμαστεί σε *in vitro* και *in vivo* έρευνες σε διάφορα μοντέλα ζώων και στην αντιμετώπιση ποικίλων παθολογικών καταστάσεων, ενώ ελάχιστες είναι οι δοκιμές στον άνθρωπο και σε κλινικό επίπεδο. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένα μόνο παραδείγματα τέτοιων δοκιμών, ώστε να γίνει κατανοητή η πιθανή σημασία της αναζήτησης τέτοιων αναστολέων.

Ο ανταγωνιστής του PAF UK74505 είναι ένας ειδικός αναστολέας με παρατεταμένη δράση και έχει δοκιμασθεί σε μοντέλα ζώων, ενώ έχει δοκιμασθεί κλινικά για το άσθμα. Σε έρευνα που μελέτησε την επίδρασή του στις τοπικές και γενικές βλάβες που δημιουργούνται από ήπια και σοβαρή ισχαιμία στην άνω μεσεντέρια αρτηρία σε ποντικούς, φάνηκε αναστολή της τοπικής και απομακρυσμένης αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας, της συσσώρευσης των ουδετεροφίλων και της εντερικής αιμορραγίας. Σε δόση 1mg/Kg ο αναστολέας αυτός ανέστειλε αποτελεσματικά το σχηματισμό τοπικού οιδήματος, την τοπική αύξηση της αιμοσφαιρίνης (δείκτη της αιμορραγίας των ιστών), και περιόρισε τις ιστοπαθολογικές διαφορές που παρατηρούνται στη σοβαρή ισχαιμία. Επίσης, η βλάβη των πνευμόνων αναστάλθηκε πλήρως και η πτώση τη πίεσης του αίματος και η λευκοπενία περιορίστηκαν σημαντικά (22). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν η υπόθεση της συμμετοχής του PAF στις ιστικές βλάβες που προκαλούνται από τη σοβαρή και ήπια ισχαιμία κυρίως στους πνεύμονες και καθιστούν πιθανή την χρήση του αναστολέα αυτού στην αντιμετώπιση των ποικίλων καταστάσεων ισχαιμίας.

Ένας άλλος ειδικός αναστολέας του PAF με παρατεταμένη δράση είναι ο Y-24180 (παράγωγο των τριαζολοθειενοδιαζεπινών) έχει δοκιμαστεί σε μοντέλα ζώων με αποτελεσματικότητα. Σε έρευνα που μελέτησε την επίδραση του στις αλλεργικές αντιδράσεις ποντικών μετά από ενεργή ευαισθητοποίησή τους με διαδερμική ένεση ωολευκοματίνης στο αυτί τους, φάνηκε ότι περιόρισε σημαντικά την άμεση και την καθυστερημένη αλλεργική αντίδραση στους ποντικούς. Συγκεκριμένα περιόρισε την αύξηση του πάχους του αυτιού, την διαπερατότητα των αγγείων, ενώ φάνηκε έντονη συνεργιστική δράση με την τοπική υδροκορτιζόλη στην αντιμετώπιση της αλλεργικής αντίδρασης. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός του Y-24180 με κάποιο τοπικό στεροειδές μπορεί να είναι χρήσιμο στη θεραπεία των φλεγμονωδών νοσημάτων του δέρματος, όπως η ατοπική δερματίτιδα (23). Σε μία άλλη έρευνα μελετήθηκε η επίδραση του Y-24180 στην αντιμετώπιση της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας που προκαλείται από το φάρμακο κυκλοσπορίνη A σε αρσενικά ποντίκια που βρίσκονταν υπό αναισθησία. Η κυκλοσπορίνη A είναι ένα ισχυρό και ευρεία χρησιμοποιημένο ανοσοκατασταλτικό φάρμακο αλλά η θεραπευτική του χρήση περιορίζεται λόγω των παρενεργειών του όπως είναι και η νεφροτοξικότητα, η πρόκληση της οποίας δεν είναι πλήρως κατανοητή, αν και πιστεύεται ότι συμμετέχουν διάφοροι χημικοί μεσολαβητές όπως ο PAF, η ενδοθηλίνη, η θρομβοξάνη A₂. Η χορήγηση του Y-24180 έτεινε να περιορίσει την μείωση της κάθαρσης της ινουλίνης που προκλήθηκε από το φάρμακο, εμπόδισε σημαντικά την μείωση της κάθαρσης του π-αμινοΐππουρικού οξέος και την αύξηση της υπολογισμένης νεφρικής αγγειακής αντίστασης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (25). Στη συγκεκριμένη *in vivo* μελέτη φάνηκε ότι η χορήγηση του Y-24180 σε δόση 3mg/Kg βελτίωσε την προκαλούμενη από την κυκλοσπορίνη επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας και εμπόδισε την εμφάνιση νεφροτοξικότητας και νεφρικής ανεπάρκειας. Η δράση του φαίνεται ότι είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με τον αναστολέα BN52021.

Ένας άλλος αναστολέας του PAF, ο SM-12502, δοκιμάστηκε ως προς την επίδρασή του στην πειραματική θρόμβωση σε ποντίκια, προκαλούμενη από ταυτόχρονη χορήγηση νεφροτοξικού ορού και λιποπολυσακχαριδίου. Η ενδοπειραματική θρόμβωση είναι σημαντική στην παθογένεση και πρόοδο της νεφρικής βλάβης στις νεφροπάθειες και επομένως η αναστολή της είναι σημαντικό κομμάτι της αντιμετώπισής τους. Στο συγκεκριμένο μοντέλο που μελετήθηκε η πειραματική θρόμβωση σχετίζεται με τη διάχυση των ουδετεροφίλων στο σπείραμα. Η χορήγηση

του αναστολέα μείωσε σημαντικά τη σπειραματική θρόμβωση με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, μείωσε την δραστηριότητα της μυελοϋπεροξειδάσης (δείκτης δραστικότητας των ουδετεροφίλων), αλλά δεν μείωσε τη διάχυση των ουδετεροφίλων στο σπείραμα (21).

Η λεξιπαφάντη ή αλλιώς BB-882 είναι ένας ειδικός αναστολέας του PAF που πρόσφατα συντέθηκε με τη μορφή φαρμάκου και έχει μελετηθεί εκτενώς σε μοντέλα ζώων, ενώ έχουν γίνει και φαρμακολογικές δοκιμές ασφαλείας και είναι πλέον διαθέσιμο για κλινικές δοκιμές. Παρουσιάζει τουλάχιστον δεκαπλάσια δραστικότητα σε σχέση με τον αναστολέα WEB 2086, επίσης πολύ μελετημένο και δοκιμασμένο, και έχει μακρύτερη διάρκεια ημίσειας ζωής (0,5-1 ώρα στον άνθρωπο). Ο αναστολέας αυτός αποδείχθηκε αποτελεσματικός στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της οξείας παγκρεατίτιδας, όπως φάνηκε από μια σειρά κλινικών μελετών. Ο PAF πιστεύεται ότι συμμετέχει στην αύξηση της παραγωγής σημαντικών μεσολαβητών κατά τη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση στην οξεία παγκρεατίτιδα, συντελώντας στην εμφάνιση του πολυοργανικού συνδρόμου. Αρχικά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και -8 (IL-8) σε αρχική κλινική μελέτη που είχε σα σκοπό να διερευνήσει την επίδραση του αναστολέα αυτού στα επίπεδα των IL-6 και IL-8 σε 83 ασθενείς με ήπια και σοβαρή οξεία παγκρεατίτιδα. Σε επόμενη κλινική μελέτη με 50 ασθενείς με σοβαρή παγκρεατίτιδα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του σκορ της οργανικής ανεπάρκειας κατά Bernard (αξιολογεί τις επιπλοκές του καρδιαγγειακού, αναπνευστικού, νεφρικού και αιματολογικού συστήματος) και οι θάνατοι ήταν λιγότεροι στην ομάδα που χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας (19). Σε έρευνα που μελέτησε την *in vivo* επίδραση του αναστολέα αυτού σε ποντίκια με ήπια, οίδηματώδη οξεία παγκρεατίτιδα μειώθηκε η σοβαρότητα της συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μείωση των κυτοκινών του ορού, της μυελοϋπεροξειδάσης των πνευμόνων και της δραστικότητας της αμυλάσης του ορού. Τα ιστολογικά αποτελέσματα εμφάνισαν μια βελτίωση αλλά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (20). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η χρήση του αναστολέα αυτού μπορεί να είναι χρήσιμη στην αντιμετώπιση της οξείας παγκρεατίτιδας. Λιγότερο ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη δράση του αναστολέα αυτού στην αντιμετώπιση της σοβαρής οξείας παγκρεατίτιδας προκύπτουν από κλινική μελέτη με 290 ασθενείς με σοβαρή οξεία παγκρεατίτιδα, που χωρίστηκαν σε δύο ομάδες η μία από τις οποίες έλαβε θεραπεία με ενδοφλέβια χορήγηση 100mg αναστολέα κάθε μέρα. Το σκορ οργανικής ανεπάρκειας μειώθηκε στην ομάδα που

έλαβε τον αναστολέα μόνο κατά την 3^η ημέρα της θεραπείας, η συστηματική σήψη επηρέασε λιγότερους ασθενείς στην ομάδα αυτή, οι τοπικές επιπλοκές εμφανίστηκαν στο 30% των ασθενών που δε έλαβαν τη θεραπεία έναντι του 20% αυτών που την έλαβαν, ψευδοκύστη εμφανίστηκε στο 14% και 5% αντίστοιχα, ενώ οι θάνατοι δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Η ιντερλευκίνη-8 και η E-σελεκτίνη (δείκτες της δραστηριότητας των ουδετεροφίλων και της βλάβης του ενδοθηλίου) αν και μειώθηκαν πιο γρήγορα στην ομάδα που έλαβε τη θεραπεία δεν εμφάνισαν διαφορές ως προς τη απόλυτη τιμή (18). Από τη συγκεκριμένη έρευνα φαίνεται ότι ο ανταγωνισμός της δράσης του PAF δεν είναι αρκετός για την αντιμετώπιση της φλεγμονώδους αντίδρασης στη σοβαρή οξεία παγκρεατίτιδα. Περαιτέρω διερεύνηση και περισσότερες κλινικές δοκιμές απαιτούνται στον τομέα αυτό.

Σε κλινική μελέτη που διερεύνησε την επίδραση της χορήγησης του αναστολέα αυτού σε 150 ασθενείς που υπέστησαν bypass στεφανιαίας αρτηρίας στην αναπόφευκτη βλάβη των πνευμόνων, δε φάνηκε καμία θετική επίδραση του φαρμάκου στη λειτουργία των πνευμόνων, ακόμα και στην περίπτωση υψηλής δόσης του (26). Αυτό πιθανά να οφείλεται στη μικρή σημασία της φλεγμονώδους αντίδρασης στη βλάβη των πνευμόνων μετά από καρδιακή εγχείρηση ή στην ανεπαρκή δόση. Έλλειψη αποτελεσματικότητας φάνηκε και στην επίδραση του αναστολέα αυτού στην αντιμετώπιση της υπότασης που προκαλείται σε ασθενείς μετά από χορήγηση στρεπτοκινάσης, σαν άμεση θεραπεία μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (27).

Σε άλλη in vivo μελέτη ο αναστολέας αυτός σε συνδυασμό με τον BB-1101, αναστολέα της μεταλλοπρωτεϊνάσης, ο οποίος επίσης αναστέλλει την απελευθέρωση του ιστικού παράγοντα νέκρωσης α, χορηγήθηκαν σε HIV-θετικά ποντίκια που εμφάνιζαν HIV-1 εγκεφαλίτιδα (χαρακτηρίζεται από διύλιση των μακροφάγων και των πολυπύρηνων κυττάρων που προέρχονται από τα μακροφάγα στον εγκέφαλο, έντονη αστρογλίωση κα). Τα φάρμακα μετά τη συνδυασμένη χορήγησή τους μείωσαν σημαντικά τη φλεγμονή του εγκεφάλου, την αστρογλίωση και την ενεργοποίηση των μικρογλίων, υποδεικνύοντας ότι τέτοια φάρμακα πιθανό να εξαλείφουν την έκκριση νευροτοξινών από τα μακροφάγα, περιορίζοντας την ένταση της HIV-1 εγκεφαλίτιδας στα άρρωστα ποντίκια με σημαντικές προεκτάσεις και για τον άνθρωπο (28).

Η δράση ενός άλλου αναστολέα του PAF, του χημικά συντιθέμενου PMS-601, μελετήθηκε σε in vitro έρευνα με καλλιέργεια ανθρώπινων HIV θετικών

μακροφάγων. Βρέθηκε ότι ο αναστολέας περιόρισε τη σύνθεση προφλεγμονωδών κυτοκινών (πιθανά υπεύθυνων για την HIV-1 άνοια που συχνά παρατηρείται στους ασθενείς) καθώς και την αναδίπλωση του ιού στα μακροφάγα, ενισχύοντας την αντιρετροϊκή δράση της ζιδοζουβίνης (29). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την πιθανή σημασία των ανταγωνιστών του PAF στο φαρμακευτικό σχήμα της αντιμετώπισης της μόλυνσης από το ρετροϊό HIV.

Σε διπλά τυφλή κλινική μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος του αναστολέα TCV-309 στην εξέλιξη 97 ασθενών με σοβαρή συστηματική φλεγμονώδη απάντηση και σηπτικό σοκ. Οι ασθενείς της ομάδας παρέμβασης έλαβαν ενδοφλέβια 1mg/Kg TCV-309 2 φορές την ημέρα για 14 ημέρες. Η συνολική επιβίωση μετά από 56 ημέρες δεν ήταν διαφορετική ανάμεσα στις δύο ομάδες, αλλά το μέσο ποσοστό της ανεπάρκειας οργάνων ανά ασθενή μετά από 14 ημέρες ήταν σημαντικά χαμηλότερο στους ασθενείς που λάμβαναν τη θεραπεία, μειώνοντας την ανάγκη για αγγειοδιαστολείς και διάλυση και βελτιώνοντας τη λειτουργία των οργάνων και τη νοσηρότητα αυτών των ασθενών (17).

Οι παραπάνω αναφορές είναι ένα μικρό μόνο δείγμα των πιθανών εφαρμογών των αναστολέων του PAF στην κλινική πράξη. Συνεχί είναι η προσπάθεια για σύνθεση νέων, πιθανά πιο αποτελεσματικών αναστολέων του PAF (30, 31).

β. Αναστολείς του PAF από φυσικές πηγές- αντιθρομβωτικές ουσίες

Έντονη είναι η αναζήτηση αντιφλεγμονωδών παραγόντων από φυσικές πηγές με σκοπό την πιθανή τους χρήση στην αντιμετώπιση ή προστασία από τις νόσους που εμπεριέχουν φλεγμονώδη αντίδραση, όπως αλλεργία, άσθμα, φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, αθηρογένεση κα, χωρίς τις ανεπιθύμητες ενέργειες των συνθετικών αναστολέων του PAF και των στεροειδών. Αρκετές τέτοιες ουσίες έχουν απομονωθεί από φυτικές κυρίως πηγές και έχει διερευνηθεί η δράση τους σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες, ενώ ελάχιστες είναι εκείνες που έχουν δοκιμασθεί και σε κλινικές μελέτες.

Από το εκχύλισμα των ξηρών φύλων του φυτού *Ginkgo biloba*, που ευδοκιμεί σε εύκρατα κλίματα, έχουν απομονωθεί τα γκινγκολίδια A,B,C και πολύ μικρές ποσότητες από τα J και M, των οποίων η ανταγωνιστική δράση έναντι του PAF είναι καλά τεκμηριωμένη (32). Εκχυλίσματα του φυτού αυτού χρησιμοποιούνται από τα αρχαία χρόνια από τους Κινέζους και άλλους σε μέρος της θεραπείας για μια ποικιλία ασθενειών και είχαν γίνει μέρος της κινέζικης φαρμακοποιίας. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει αποτελεσματικότητα των εκχυλισμάτων του φυτού αυτού σε

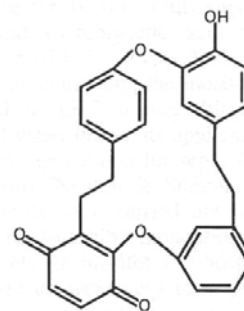
καταστάσεις υποξίας και στην ασθένεια Alzheimer. Φαίνεται ότι για την προστατευτική και θεραπευτική δράση του φυτού αυτού εν μέρει ευθύνεται η παρουσία του γκινγκολιδίου B ή BN 52021 που είναι ένας ισχυρός ανταγωνιστής του PAF (32). Τεράστιος είναι ο αριθμός των *in vitro* και *in vivo* μελετών που τεκμηριώνουν την ανταγωνιστική δράση του BN 52021 έναντι του PAF χωρίς να έχει εξακριβωθεί ακόμα ο ακριβής μηχανισμός της δράσης του. Επίσης έχει εγκριθεί η φαρμακευτική του χρήση και έχει δοκιμασθεί με επιτυχία σε αρκετές κλινικές μελέτες.

Σε πρόσφατη κλινική μελέτη, δοκιμάσθηκε η δράση του BN 52021 μετά από χορήγησή του σε μικρή και μεγάλη δόση σε πνεύμονες, που επρόκειτο να μεταμοσχευτούν σε ασθενείς. Η συνήθης πνευμονική δυσλειτουργία μετά τη μεταμόσχευση χαρακτηρίζεται από χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου, αυξημένη αγγειακή αντίσταση πνευμόνων και πνευμονικό οίδημα, στην εμφάνιση των οποίων είναι πολύ πιθανό να συμμετέχει ο PAF. Διάφορα αιμοδυναμικά χαρακτηριστικά σχετικά με τη λειτουργία των πνευμόνων καθώς και η συγκέντρωση του PAF πριν και μετά την εγχείρηση μετρήθηκαν. Σε 32 ώρες η αρτηριοφλεβική διαφορά του οξυγόνου εμφάνισε βελτίωση στην ομάδα υψηλής και χαμηλής δόσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ τα επίπεδα του PAF ήταν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα υψηλής δόσης μετά από 10 λεπτά από τη χορήγηση του BN 52021 και μετά από 10 λεπτά και 6 ώρες από την εγχείρηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μελέτη αυτή υπέδειξε ότι η χορήγηση υψηλής δόσης BN 25021 μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας κατά την ισχαιμική περίοδο μετά την μεταμόσχευση (33).

Σε *in vitro* μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος του φυτού *petasites hybridus* (Ze339) και του πιθανά βασικότερου δραστικού συστατικού του, της πετασίνης, στο μεταβολισμό και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, ηωσινόφιλων και μακροφάγων του ανθρώπου. Πράγματι και τα δύο αυτά επιμέρους συστατικά ανέστειλαν πλήρως την προκαλούμενη από τον PAF αύξηση των επιπέδων ασβεστίου και την σύνθεση λευκοτριενών στα ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα και μακροφάγα (34). Σε άλλη *in vitro* έρευνα μελετήθηκε η επίδραση 9 ξανθονών απομονωμένων από τα φυτά *Calophyllum inophyllum*, *Garcinia opaca*, *Garcinia bancana*, στη δράση του PAF σε αιμοπετάλια κουνελιού. 5 από αυτές εμφάνισαν ισχυρή αναστολή του PAF με IC₅₀ από 4 μέχρι και 44μM. Από την εξακρίβωση των χημικών τους δομών φαίνεται ότι η φαινυλική ομάδα στον C-2, η διμέθυλπροπ-2-ενυλο ομάδα στον C-4 και η

υδρόξυλο ομάδα στον C-5 δρουν θετικά στη δέσμευση τους με τον υποδοχέα του PAF (35).

Η *in vitro* μελέτη της επίδρασης της μαρκαντινκουανίνης που απομονώθηκε από το φυτό *Reboulia hemisphaenica* (εικόνα 5) σε πλυμμένα αιμοπετάλια από κουνέλι έδειξε ότι το δραστικό αυτό συστατικό ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση του ATP που προκλήθηκε από την θρομβίνη, τον PAF, το κολλαγόνο, το αραχιδονικό οξύ ή τον παράγοντα U46619. Μετά από περαιτέρω διερεύνηση φάνηκε ότι ο πιθανότερος μηχανισμός αυτής της αναστολής είναι η αναστολή της διάσπασης της φωσφατιδυλοϊνositόλης, όποτε αναστέλλεται η κινητοποίηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων (36).



Εικόνα 5: Χημική δομή της μαρκαντινκουανίνης

Δραστικά συστατικά που απομονώθηκαν από το *Aromadendron elegans* Blume εμφάνισαν ισχυρή αναστολή της σύνδεσης του 3H PAF με τον υποδοχέα του. Συγκεκριμένα τα (-)-N-ακέτυλανοναΐνη, 1-(N-ακέτυλ-N-μεθυλαμινο)αιθυλ-3,4,6-τριμεθοξυ-7-υδροξυ-φαινανθρένιο και πρεντισεντρίνιο προκάλεσαν αναστολή με IC₅₀ 52,4, 38,6 και 29,8 μM αντίστοιχα (37). Επίσης, η πινουσολίδη, μια διτερπενοειδής λακτόνη που απομονώθηκε από το φυτό *Biota orientalis*, φαίνεται ότι είναι ένας ισχυρός ανταγωνιστής του PAF που δρα μέσω της δέσμευσης του υποδοχέα του (38).

Ακόμα και σε ζωικούς οργανισμούς και βακτήρια έχουν βρεθεί και απομονωθεί αναστολείς του PAF. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη ενεργοποίησης του GM2 ή αλλιώς ο Ενεργοποιητής, μια μικρή, θερμοσταθερή πρωτεΐνη, ανθεκτική στη δράση των πρωτεασών που συντίθενται από τον άνθρωπο και ορισμένα βακτήρια και φαίνεται ότι έχει την ικανότητα να δεσμεύει τον PAF και να μην επιτρέπει την σύνδεσή του με τον υποδοχέα του (39). Έχει ανιχνευθεί στα λυσοσώματα των ινοβλαστών και της επιδερμίδας του ανθρώπου και έχει φανεί ότι μπορεί να εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η μελλοντική της χρήση σαν αναστολέας του PAF είναι πολύ ελκυστική και ενδιαφέρουσα, καθώς παράγεται φυσικά από τον ανθρώπινο οργανισμό, είναι ιδιαίτερα ανθεκτική και μπορεί να παραχθεί σε μεγάλες ποσότητες από βακτήρια. Ένας άλλος ενδογενής αναστολέας της δράσης του PAF έχει απομονωθεί από το ήπαρ ποντικού με δομή

φωσφατιδυλογλυκερόλης που ανέστειλε τη συσσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού από τον PAF και τη θρομβίνη (40).

Η σημασία του PAF σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις και τα πιθανά οφέλη από την χρήση αναστολέων της δράσης του, οδήγησαν κάποιους ερευνητές στην αναζήτηση βιολογικά δραστικών μορίων, κυρίως λιπιδίων, που εμφανίζουν αντιθρομβωτική δράση, στα τρόφιμα. Πράγματι η ιδέα της πρόσληψης μικροθρεπτικών αντιθρομβωτικών ουσιών και πιθανών αναστολέων του PAF από την τροφή φαίνεται ιδιαίτερα ελκυστική και παρέχει πολύτιμες γνώσεις για την πιθανή εξήγηση του προστατευτικού ρόλου της διατροφής και ορισμένων συγκεκριμένων διατροφικών επιλογών στην προστασία από διάφορες παθήσεις, όπως η καλά τεκμηριωμένη προστατευτική δράση της μεσογειακής δίαιτας στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Έχουν ανιχνευθεί βιολογικά δραστικά λιποειδή που αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF σε ποικιλία τροφίμων όπως το ελαιόλαδο, το μέλι, το γάλα και το γιαούρτι, το σκουμπρί.

Σε έρευνα όπου αναλύθηκαν τα λιποειδή του ελαιολάδου με χρωματογραφικές μεθόδους και ελέγχθηκαν τα επιμέρους κλάσματα ως προς την επίδρασή τους σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού βρέθηκε ότι ένα από τα κλάσματα αυτά ανέστειλε ειδικά τον PAF με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ σε μεγαλύτερες ποσότητες προκαλούσε συσσώρευση των αιμοπεταλίων μη αναστρέψιμη. Δομική ανάλυση του συστατικού αυτού έδειξε ότι πιθανότατα επρόκειτο για μίγμα τοκοφερολών και τριελαϊνής (41). Σε ακόμα μία *in vitro* μελέτη ανιχνεύθηκε η ύπαρξη υψηλών επιπέδων ανταγωνιστών του PAF στο ελαιόλαδο, κυρίως πολικής φύσεως. Η δομή του πιο δραστικού κλάσματος των πολικών λιποειδών αναγνωρίστηκε σαν γλυκερογλυκολιποειδούς (42). Η ύπαρξη τέτοιων βιολογικά δραστικών μορίων στο ελαιόλαδο, που αναστέλλουν τη δράση του PAF ή περιορίζουν την επίδρασή του δρώντας σαν ασθενέστεροι αγωνιστές του, πιθανά να εξηγούν και την προστατευτική δράση που φαίνεται να έχει η κατανάλωσή του σε μέρος της μεσογειακής διατροφής στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων (43).

Ενδιαφέρουσα είναι η ανίχνευση βιολογικά δραστικών λιποειδών στο λευκό και κόκκινο κρασί. Σε έρευνα που μελέτησε την επίδραση *in vitro* των απομονωμένων λιποειδών από κόκκινο κρασί σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ανιχνεύθηκε η ύπαρξη ποικιλίας αναστολέων του PAF, καθώς και συστατικά που ανταγωνίζονται τη δράση του μέσω των υποδοχέων του και περιορίζουν τις βιολογικές επιδράσεις του σε διάφορα κύτταρα και ιστούς. Ορισμένα από τα λιποειδή αυτά φαίνεται ότι

αναστέλλουν και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων από θρομβίνη. Τα συστατικά αυτά φαίνεται ότι ανήκουν στην ομάδα των γλυκο- και φωσφολιπιδίων όπως προέκυψε από τη μελέτη της χημικής τους δομής (44). Σε παρόμοια έρευνα που μελέτησε την βιολογική δραστικότητα των επιμέρους κλασμάτων των λιποειδών από ποικιλία λευκών κρασιών φάνηκε πιο έντονη η παρουσία κλασμάτων που προκαλούσαν συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού σε σχέση με τα κλάσματα των κόκκινων κρασιών και οι μούστοι των λευκών κρασιών φάνηκε ότι είχαν περισσότερα κλάσματα που προκαλούσαν συσσώρευση σε σχέση με τα αντίστοιχα κρασιά τους. Πάντως τα λιπίδια λευκών και κόκκινων κρασιών που προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων φαίνεται ότι έχουν κοινή χημική δομή. Περαιτέρω ανάλυση του λευκού κρασιού που προέρχεται από το Ελληνικό σταφύλι ρομπόλα και εμφάνιζε την πιο έντονη βιολογική δράση έδειξε ότι υπάρχουν πολλά βιολογικά δραστικά συστατικά που αναστέλλουν τη δράση του PAF και της θρομβίνης ή δρουν σαν αγωνιστές του PAF, περιορίζοντας τις βιολογικές του επιδράσεις σε διάφορα κύτταρα. Από τη δομική ανάλυση φαίνεται ότι τα πιο δραστικά λιπίδια στο μούστο είναι φωσφογλυκολιπίδια και στο κρασί γλυκολιπίδια παρόμοιας όμως χημικής δομής που φαίνεται ότι προέρχονται από τα σταφύλια (45). Αυτές οι ουσίες είναι πιθανό να ευθύνονται και για την προστατευτική δράση της μέτριας κατανάλωσης κρασιού και κυρίως κόκκινου κρασιού από την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (46).

Με χρωματογραφική ανάλυση των λιποειδών του γάλακτος και έλεγχο της βιολογικής δραστικότητας των επιμέρους κλασμάτων των λιποειδών του σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού φάνηκε η ύπαρξη ειδικών αναστολέων του PAF, ενώ κανένα από τα κλάσματα δεν προκαλούσαν συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα ίδια αποτελέσματα εμφάνισε και ο έλεγχος της βιολογικής δραστικότητας των λιποειδών του γιαουρτιού με πιο έντονη όμως ειδική αναστολή της δράσης του PAF σε σχέση με αυτή των λιποειδών του γάλακτος (47).

Μετά από χρωματογραφικό διαχωρισμό των λιποειδών μελιού και κηρών και έλεγχο της βιολογικής δραστικότητας των επιμέρους κλασμάτων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού, βρέθηκαν 6 δραστικά συστατικά στο μέλι που ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF και τη θρομβίνη, αν και απαιτούνταν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις από PAF για το αποτέλεσμα αυτό. Ίχνη από τα 4 πιο δραστικά από αυτά τα συστατικά ανιχνεύθηκαν και στο κηρό. Η δομική τους ανάλυση έδειξε ότι πρόκειται για ανοιχτής αλυσίδας δομικά ανάλογα του PAF (48).

Βιολογικά δραστικά λιπίδια ανιχνεύθηκαν και στο ψάρι σκουμπρί, αφού απομονώθηκαν από τη μυϊκή του μάζα και διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά σε επιμέρους κλάσματα. Από τα ουδέτερα λιποειδή ορισμένα ανέστειλαν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού από τον PAF και τη θρομβίνη και ένα από αυτά αναγνωρίστηκε σαν το 1-0-αλκυλ-2-μεθοξυ-γλυκερόλη, ενώ ένα άλλο φαίνεται ότι ανήκει στην κλάση των τριγλυκεριδίων. Από τα φωσφολιπίδια 3 προκάλεσαν συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Δύο από αυτά φαίνεται ότι προκαλούν δοσοεξαρτώμενη συσσώρευση μέσω των υποδοχέων του PAF και φαίνεται ότι είναι ανάλογα της φωσφατιδυλοχολίνης. Επίσης, βρέθηκαν και φωσφολιπίδια που ανέστειλαν τη συσσώρευση που προκαλεί ο PAF. Ένα από αυτά εμφάνισε δοσοεξαρτώμενη αναστολή και του PAF και της θρομβίνης και φαίνεται ότι είναι ανάλογο της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης, ενώ ένα άλλο ανέστειλε ειδικά τη δράση του PAF (49). Λιπίδια με ισχυρή ανταγωνιστική δράση έναντι του PAF στη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ανιχνεύθηκαν και στον φρέσκο μπακαλιάρο και ανήκαν κυρίως στα ουδέτερα αλλά εν μέρει και στα πολικά λιπίδια. Στον τηγανητό μπακαλιάρο η ανίχνευση λιπιδίων με ανταγωνιστική δράση στον PAF ήταν εντονότερη ακόμα και στα πολικά λιπίδια, πιθανά λόγω της απορρόφησης φυτικού ελαίου κατά το τηγάνισμα (50). Σε *in vivo* έρευνα που μελέτησε την επίδραση κατανάλωσης ελαίου από ήπαρ μπακαλιάρου σαν πρόσθετο στη διατροφή υγιών ατόμων για 14 ημέρες βρέθηκε σημαντική μείωση στη τάση για συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων τους από θρομβίνη. Η αλλαγή της σύνθεσης των φωσφολιπιδίων των αιμοπεταλίων με αύξηση της περιεκτικότητάς τους σε EPA και DHA ήταν σημαντική μετά την κατανάλωση του ελαίου και πιθανά να ευθύνεται για την αλλαγή στις αιματολογικές παραμέτρους και στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων (51).

Είναι σαφές ότι υπάρχουν βιολογικά δραστικά λιπίδια στα τρόφιμα που τροποποιούν τις ιδιότητες και τη σύστασή τους ανάλογα με την επεξεργασία που υφίστανται, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με τη δράση μικροοργανισμών στο γάλα για το σχηματισμό γιαουρτιού (47) ή με το τηγάνισμα του μπακαλιάρου (50). Η εύρεση τέτοιων βιολογικά δραστικών λιπιδίων στα τρόφιμα βοηθάει στην πληρέστερη κατανόηση και εξακρίβωση της διατροφικής αξίας των τροφίμων και παρέχει πιθανές εξηγήσεις για τις ευεργετικές ιδιότητες ορισμένων από αυτές όπως στην περίπτωση του παρθένου ελαιολάδου. Στην παρούσα μελέτη ελέγχουμε τη βιολογική δραστηριότητα των ολικών, πολικών και ουδέτερων λιποειδών από 5 συχνά

καταναλισκόμενα τρόφιμα (γάλα, γιαούρτι, μαργαρίνη, ζαμπόν, κασέρι) καθώς και τα λιποειδή των αντίστοιχων light προϊόντων, ώστε να εξακριβώσουμε αν εμφανίζεται κάποια σημαντική διαφορά στη βιολογική δραστηριότητα των λιποειδών τους, λόγω της αφαίρεσης μέρους του λίπους και της επεξεργασίας που υφίστανται.

4.Light τρόφιμα: Εφαρμογές και προβληματισμοί

α. Σκοπός της παραγωγής light προϊόντων και κατά πόσο επιτυγχάνεται

Ο αρχικός σκοπός της παραγωγής των light τροφίμων με χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος ήταν να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση συγκεκριμένων προβλημάτων υγείας και διαιτητικών αναγκών, όπως στην περίπτωση των διαβητικών, των παχύσαρκων, των καρδιοπαθών, οπότε απαιτείται αυστηρός περιορισμός του λίπους και της θερμιδικής πρόσληψης στη δίαιτα. Ο καταναλωτής μπορούσε να τα βρει σε ειδικά διαμορφωμένα ράφια, ξεχωριστά από τα υπόλοιπα προϊόντα, και η συγκριτικά υψηλή τιμή τους περιόριζε την ευρεία κατανάλωσή τους σε καθημερινή βάση. Τα τελευταία χρόνια η ραγδαία εξέλιξη στον τομέα της τεχνολογίας τροφίμων έχει οδηγήσει σε αισθητή μείωση του κόστους των light τροφίμων και σε βελτίωση των οργανοληπτικών τους ιδιοτήτων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την έντονη στροφή των καταναλωτών προς πιο «υγιεινά» τρόφιμα, χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος και ζάχαρη, έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια σε αυξημένη ζήτηση και κατανάλωση των light τροφίμων. Όλο και περισσότερα light προϊόντα προμηθεύονται στην αγορά και γίνονται άμεσα αποδεκτά από τους καταναλωτές.

Η τάση αυτή των καταναλωτών προς τα light τρόφιμα φαίνεται και από τη σύγκριση της κατανάλωσής τους από μέρος του Γαλλικού πληθυσμού το 1986 και το 2001. Τα ποσοστά των ανδρών που καταναλώνουν τρόφιμα μειωμένης περιεκτικότητας σε λίπος είναι αντίστοιχα 18% και 72,2%, ενώ για τις γυναίκες τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 28% και 80,2% (52). Οι τεράστιες αυτές διαφορές είναι πιθανό να οφείλονται εν μέρει στη διαφορετικότητα των πληθυσμών ως προς τα κίνητρα και το ενδιαφέρον για την υγεία και τη διατροφή, αλλά κυρίως φανερώνουν την αύξηση της διαθεσιμότητας περισσότερων light τροφίμων στην αγορά τα τελευταία δέκα χρόνια, με όλο και καλύτερες γευστικές ιδιότητες, που γίνονται όλο και περισσότερο αποδεκτά από τους καταναλωτές.

Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, τα πιο δημοφιλή light προϊόντα είναι τα γαλακτοκομικά χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος (γάλα, γιαούρτι, τυριά), και ακολουθούν οι διάφορες σάλτσες, τα κρεατοσκευάσματα (ζαμπόν, λουκάνικα, πάριζα), μαργαρίνη, βούτυρα (53) (52, 54). Στις περισσότερες περιπτώσεις οι καταναλωτές τους δηλώνουν ότι τα χρησιμοποιούν για να βελτιώσουν την υγεία τους και να σταθεροποιήσουν ή να μειώσουν το βάρος τους, χωρίς όμως να ακολουθούν συγκεκριμένη δίαιτα ή οδηγίες(53). Είναι χαρακτηριστικό ότι οι συμμετέχοντες σε έρευνα για την επίδραση των light τροφίμων σε διαβητικούς ασθενείς δήλωσαν ότι χρησιμοποιούν τρόφιμα με μειωμένη περιεκτικότητα σε λίπος μετά από συμβουλή κάποιου φίλου ή του γιατρού τους ή μετά από ενημέρωση από κάποιο περιοδικό, αλλά σε καμία περίπτωση μετά από συμβουλή του διαιτολόγου(55). Επίσης σε έρευνα που έγινε σε γυναικείο πληθυσμό που κατανάλωνε καθημερινά light τρόφιμα φάνηκε ότι δεν μπορούσαν να αναγνωρίσουν βασικές πηγές λίπους στη δίαιτά τους και ενώ αναγνώριζαν την ανάγκη για περιορισμό του προσλαμβανόμενου διαιτητικού λίπους, δεν μπορούσαν να εφαρμόσουν συγκεκριμένες οδηγίες ή να κατανοήσουν τη σχέση λίπους και ενεργειακής πρόσληψης (56). Τα δεδομένα αυτά φανερώνουν την αδυναμία του πληθυσμού να κατανοήσει και να εφαρμόσει τις γενικές διαιτητικές οδηγίες για τη μείωση του διαιτητικού λίπους, μεταφράζοντάς τις σε συγκεκριμένες διατροφικές συμπεριφορές και επιλογές.

Ο βασικός σκοπός της κατανάλωσης light τροφίμων, όπως φαίνεται και από τα παραπάνω δεδομένα, είναι η μείωση του διαιτητικού λίπους και κυρίως του κορεσμένου καθώς και ο έλεγχος του βάρους με έναν εύκολο, ανώδυνο τρόπο. Λίγες έρευνες έχουν ασχοληθεί με το κατά πόσο η τακτική χρήση light τροφίμων στον ελεύθερο γενικό πληθυσμό επιτυγχάνει την μείωση του προσλαμβανόμενου λίπους και ενέργειας. Σε διπλά τυφλή έρευνα που έγινε υπό εργαστηριακές ελεγχόμενες συνθήκες, μελετήθηκε η αντικατάσταση του λίπους σε ορισμένα τρόφιμα με ολέστρα (ένα καλά μελετημένο και πολυχρησιμοποιημένο υποκατάστατο λίπους που δεν παρέχει ενέργεια κατά την κατανάλωσή του) στην τροφική επιλογή και ενεργειακή πρόσληψη κανονικών και παχύσαρκων ατόμων (57). Πράγματι, μετά από παρέμβαση δύο εβδομάδων και κατανάλωση συγκεκριμένου διαιτολογίου, στο οποίο σημαντική ποσότητα λίπους είχε αντικατασταθεί από ολέστρα, η ημερήσια πρόσληψη λίπους μειώθηκε κατά 22γρ και η ενεργειακή πρόσληψη κατά 782KJ/ημέρα, χωρίς αρνητικές γαστρεντερικές επιπλοκές. Τέτοιου τύπου έρευνες όμως μειονεκτούν, στο ότι εξετάζουν την επίδραση των light προϊόντων υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες και

χωρίς ο καταναλωτής να γνωρίζει τι καταναλώνει. Σε άλλες έρευνες που μελέτησαν τη χρήση της ολέστρα σαν υποκατάστατο λίπους στην καθημερινή ζωή καταναλωτών φάνηκε μείωση της πρόσληψης λίπους, αλλά όχι της ολικής ενέργειας σε παχύσαρκους και μη, άνδρες και γυναίκες. Σε μελέτη που διήρκησε 3 μήνες η χρήση της ολέστρα σε ποικιλία τροφίμων αν και δε μείωσε σημαντικά την ενεργειακή πρόσληψη περιορίσε την πρόσληψη βάρους που παρατηρήθηκε, κατά την περίοδο κατανάλωσης των τροφίμων που ήταν πλήρη σε λίπος (58).

Σε άλλη έρευνα που μελέτησε την επίδραση της κατανάλωσης τροφίμων με τροποποιημένη περιεκτικότητα σε λίπος σε σημαντικό δείγμα Αμερικάνικου πληθυσμού (878 άνδρες και 853 γυναίκες), φάνηκε ότι με την κατανάλωση light τροφίμων είναι πιο πιθανό να επιτευχθεί χαμηλότερη πρόσληψη λίπους και κυρίως κορεσμένου λίπους, καθώς και υψηλότερη πρόσληψη βιταμίνης Α, φολικού και σιδήρου κυρίως λόγω της μεγαλύτερης ποικιλίας τροφών στη διαίτα(59). Ενδεικτικό όμως είναι το ότι στην περίπτωση χαμηλής πρόσληψης λίπους, όσοι χρησιμοποιούσαν τακτικά light τρόφιμα εμφάνιζαν υψηλότερη ενεργειακή πρόσληψη από αυτούς που επέλεγαν άλλες μεθόδους μείωσης του προσλαμβανόμενου διαιτητικού λίπους.

Σε παρόμοια συμπεράσματα καταλήγει και μία διασταυρούμενη μελέτη σε σημαντικό δείγμα του γαλλικού πληθυσμού (2300 άνδρες και 1979 γυναίκες, ηλικίας 45-60 ετών) το οποίο διαχωρίστηκε σε ομάδες ανάλογα με την συχνότητα κατανάλωσης light τροφίμων. Η τελευταία συσχετίστηκε με ανθρωπομετρικές και βιοχημικές παραμέτρους (52). Οι χρήστες τροφίμων με μειωμένη περιεκτικότητα σε ζάχαρη ήταν βαρύτεροι από τους μη χρήστες και είχαν υψηλότερες τιμές BMI και περιφέρεια μέσης/ περιφέρεια γλουτών, ενώ μόνο οι γυναίκες χρήστες τροφίμων με μειωμένο λίπος είχαν υψηλότερο σωματικό βάρος και BMI από αυτές που δε τα χρησιμοποιούσαν. Επίσης οι χρήστες τροφίμων με χαμηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη είχαν υψηλότερες τιμές τριγλυκεριδίων και γλυκόζης νηστείας σε σχέση με αυτούς που δεν χρησιμοποιούσαν light τρόφιμα. Η χρήση των light τροφίμων, και κυρίως των τροποποιημένων ως προς το περιεχόμενο σε λίπος, οδήγησε σε δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε αρκετά μικροθρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνη Ε, Β6, μαγνήσιο στους άνδρες και βιταμίνη Β6, μαγνήσιο και ασβέστιο στις γυναίκες. Οι χρήστες τροφίμων με μειωμένη περιεκτικότητα σε ζάχαρη εμφάνιζαν αυξημένη κατανάλωση πρωτεΐνης, κυρίως ζωικής προέλευσης, και λίπους και μειωμένη πρόσληψη

υδατανθράκων. Αντίθετα, οι χρήστες τροφίμων μειωμένων σε λίπος, κατανάλωναν λιγότερο λίπος και περισσότερους υδατάνθρακες και πρωτεΐνη στη διαίτά τους (52).

Σε μία άλλη έρευνα μελετήθηκε η επίδραση της ελεύθερης πρόσβασης σε light τρόφιμα ως προς την πρόσληψη ενέργειας και μακροθρεπτικών σε διαβητικούς και υγιείς(55). Συγκεκριμένα, χρήση τροφίμων με χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος προς αντικατάσταση των αντίστοιχων πλήρων για 3 ημέρες από άτομα που ζούσαν σε ελεύθερες συνθήκες μείωσε σημαντικά την πρόσληψη λίπους, χοληστερόλης και κορεσμένου λίπους, χωρίς να αυξάνει την πρόσληψη υδατανθράκων. Τόσο οι διαβητικοί, όσο και οι υγιείς αντέδρασαν με τον ίδιο τρόπο στα light τρόφιμα και δεν οδηγήθηκαν σε υπερκατανάλωση αυτών ή άλλων τροφίμων. Επίσης παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της πρόσληψης υδατανθράκων που δεν ήταν στατιστικά σημαντική καθώς και μία τάση για μείωση της ενεργειακής πρόσληψης. Η έρευνα αυτή αν και διεξήχθη σε ελεύθερες συνθήκες, είχε πολύ μικρή διάρκεια παρέμβασης (3 ημέρες) και οι επιδράσεις που παρατηρήθηκαν είναι δυνατό να τροποποιηθούν σε περιπτώσεις μεγαλύτερων χρονικών διαστημάτων.

Σαφέστερα αποτελέσματα δίνει η μελέτη των διατροφικών επιδράσεων της ελεύθερης κατανάλωσης light τροφίμων από μη παχύσαρκες, γυναίκες καταναλώτριες μετά από παρέμβαση δέκα εβδομάδων (54). Η κατανάλωση τροφών του εμπορίου με μειωμένη περιεκτικότητα λίπους από καταναλωτές στο φυσικό τους περιβάλλον και υπό καθημερινές συνθήκες διαβίωσης για δέκα εβδομάδες οδήγησε σε σημαντική μείωση του προσλαμβανόμενου λίπους (από 37% κατά μέσο όρο σε 33% μετά από 10 εβδομάδες), κυρίως στα άτομα με αρχική υψηλή πρόσληψη λίπους. Μικρή μείωση παρατηρήθηκε σε όσους είχαν αρχική πρόσληψη λίπους <35% της ολικής ενεργειακής του πρόσληψης. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην ολική ενεργειακή πρόσληψη ή στο σωματικό βάρος των καταναλωτών. Παρόμοια έρευνα μελέτησε την κατανάλωση light τροφίμων από 76 υγιείς, μη παχύσαρκους εθελοντές για 6 μήνες, σε ελεύθερες, καθημερινές συνθήκες, με αποτέλεσμα τη μείωση του διαιτητικού λίπους και της ενεργειακής πρόσληψης, που όμως δεν ήταν αρκετή για να μειωθεί το βάρος των εθελοντών(60).

Επίσης, έχει φανεί από αρκετές έρευνες σε ελεύθερους πληθυσμούς ότι η χρήση light τροφίμων και τροφίμων με υποκατάστατα λίπους, όπως η ολέστρα, οδηγεί σε μικρή, αλλά σημαντική αύξηση της κατανάλωσης τροφής και ενέργειας, όταν οι καταναλωτές γνωρίζουν ότι κατανάλωναν τρόφιμα χαμηλής περιεκτικότητας λίπους και ενέργειας (58). Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποτελεί και μια πιθανή εξήγηση

για το «Αμερικανικό παράδοξο». Παρόλο που οι έρευνες τις τελευταίες δεκαετίες παρουσιάζουν σημαντική μείωση του λίπους στη διαίτα, η εμφάνιση της παχυσαρκίας, συνεχίζει να αυξάνει στην Ευρώπη και στην Αμερική. Το φαινόμενο αυτό είναι πιθανό να οφείλεται εκτός των άλλων και στην υπερκατανάλωση των light τροφίμων, που αν και έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος, σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο λόγω της περιεκτικότητάς τους σε απλούς υδατάνθρακες. Ακόμα όμως και στην περίπτωση που το ενεργειακό περιεχόμενο των light τροφίμων είναι χαμηλότερο από τα αντίστοιχα πλήρη, η αυξημένη κατανάλωσή τους με τη δικαιολογία ότι είναι light, οδηγεί ουσιαστικά σε υψηλότερη ενεργειακή πρόσληψη (61). Στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγεί και το συχνό φαινόμενο της «αυτό-επιβράβευσης» που παρατηρείται ταυτόχρονα με την τακτική χρήση των light τροφίμων κατά το οποίο ο καταναλωτής τρώει περισσότερο από τις άλλες τροφές επειδή εξοικονομεί θερμίδες από τα light τρόφιμα. Σε έρευνα που έγινε στη Γαλλία το 1986 η χρήση των light τροφίμων από τους άνδρες συνοδευόταν από αυξημένη πρόσληψη μπισκότων, σοκολάτας, μαρμελάδας και μελιού (52). Φαίνεται λοιπόν, ότι δεν αρκεί η μεμονωμένη αντικατάσταση των πλήρων τροφών με τα αντίστοιχα light για να επιτευχθεί μείωση της ενεργειακής πρόσληψης και του σωματικού βάρους, αλλά είναι καλύτερο και ασφαλέστερο να συνδυαστεί με την κατανάλωση τροφών χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος και υψηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες και σύνθετους υδατάνθρακες, όπως φρούτα, λαχανικά κτλ.(62).

β. Επίδραση της επεξεργασίας στη θρεπτική αξία των light προϊόντων

Ένας επιπλέον προβληματισμός για τα light τρόφιμα, εκτός από την αποτελεσματικότητά τους, είναι αν και κατά πόσο υποβαθμίζεται η διατροφική τους αξία κατά την επεξεργασία και την αφαίρεση του λίπους που υφίστανται. Με την ευρεία κατανάλωση των τροφών αυτών το λίπος της διαίτας μεταβάλλεται τόσο ποσοτικά, όσο και ποιοτικά και επομένως είναι πιθανό η κατανάλωσή τους να επηρεάζει την κατάσταση οξειδωτικού στρες στον οργανισμό. Περιορισμένη είναι η ερευνητική δραστηριότητα στον τομέα αυτό. Σε μια έρευνα που μελέτησε την επίδραση της κατανάλωσης light τροφίμων σαν μέρος της καθημερινής, ελεύθερης διαίτας 76 υγιών, μη παχύσαρκων ατόμων σε διάφορες παραμέτρους της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού δε βρέθηκε σημαντική μεταβολή (60). Αν και η πρόσληψη βιταμίνης E βρέθηκε σημαντικά μειωμένη, η συγκέντρωση των προϊόντων υπεροξειδωσης των λιποειδών στο πλάσμα, η δραστηριότητα των

ενζυμικών συστημάτων των ερυθροκυττάρων για την κατανάλωση των ελεύθερων ριζών (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, υπεροξειδάση της δισμουτάσης, καταλάση), καθώς και η συγκέντρωση των λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών βιταμινών στο πλάσμα (β-καροτένιο, λυκοπένιο, α-τοκοφερόλη) δε μεταβλήθηκαν.

Σε μία άλλη έρευνα που μελέτησε την επίδραση της αφαίρεσης του λίπους από πλήρες αγελαδινό γάλα στην περιεκτικότητά του σε βιταμίνη Ε, βρέθηκε ότι για κάθε 1 γρ. ολικού λίπους που αφαιρείται, η α-τοκοφερόλη μειώνεται κατά 17μg (63). Η α-τοκοφερόλη αντιπροσωπεύει το 84-92% της βιταμίνης Ε σε όλους τους τύπους γάλατος, ενώ η γ-τοκοφερόλη και η α-τοκοτριενόλη συνεισφέρουν το πολύ ~5% η κάθε μία, και η γ-τοκοτριενόλη δεν ανιχνεύθηκε. Όπως φαίνεται από τη συγκεκριμένη έρευνα η α-τοκοφερόλη σχετίζεται κυρίως με τα σωμάτια του λίπους και όχι με τις μεμβράνες που τα περιβάλλουν και είναι ιδιαίτερα πλούσιες σε χοληστερόλη. Αν και το γάλα δεν μπορεί να θεωρηθεί πρωταρχική πηγή βιταμίνης Ε σε σύγκριση με άλλες πιο πλούσιες πηγές όπως τα αμύγδαλα και το ελαιόλαδο, παραμένει το πιο συχνά καταναλισκόμενο γαλακτοκομικό προϊόν και αν καταναλώνεται σε αρκετά μεγάλες ποσότητες, σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν σημαντική πηγή της βιταμίνης Ε.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της καταγραφής της διατροφικής πρόσληψης του 1994-1995 φαίνεται ότι η κατανάλωση του πλήρους γάλακτος μειώνεται σε αντίθεση με τα άπαχο γάλα του οποίου η κατανάλωση αυξάνει. Το ίδιο συμβαίνει και στον παιδικό πληθυσμό, αφού η κατανάλωση ημίπαχου γάλακτος έναντι του πλήρους συστήνεται στις ΗΠΑ για παιδιά ηλικίας >2 ετών, σα μέθοδος μείωσης του ολικού και κορεσμένου λίπους στη διαίτα, ενώ σημαντικό ποσοστό παιδιών <1 έτους φαίνεται να καταναλώνουν light γαλακτοκομικά (64). Παρόμοια σύσταση για αποφυγή του πλήρους γάλακτος και προτίμηση των ημίπαχων ή άπαχων γαλακτοκομικών δόθηκε επίσης από το 1977 για τους πληθυσμούς των ΗΠΑ και Καναδά (65). Τέτοιου είδους συστάσεις επεκτείνονται και στους πληθυσμούς άλλων χωρών. Πράγματι τα γαλακτοκομικά προϊόντα και κυρίως το πλήρες γάλα έχουν αναγνωρισθεί σα βασικές πηγές ολικού και κορεσμένου λίπους στη διαίτα, αλλά αποτελούν και ένα από τα πιο σημαντικά τρόφιμα της διαίτα των παιδιών, απαραίτητα για την ομαλή ανάπτυξη και υγεία τους (65). Επομένως με την αφαίρεση του λίπους τους είναι πιθανό να αφαιρείται και ένα σημαντικό μέρος της διαιτητικής βιταμίνης Ε, που πρέπει να λαμβάνουν, της οποίας η σημασία σαν αντιοξειδωτικό στην προστασία έναντι των

καρδιαγγειακών νοσημάτων, καθώς και σαν απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για την ομαλή ανάπτυξη είναι καλά τεκμηριωμένη.

Αν και τα πλήρη γαλακτοκομικά αποτελούν σημαντική πηγή κορεσμένου λίπους, το οποίο έχει ενοχοποιηθεί για αύξηση της LDL- χοληστερόλης και αύξηση του κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα, φαίνεται ότι το λίπος του γάλακτος είναι λιγότερο υπερχοληστερολαιμικό σε σχέση με αυτό που αναμένεται από το περιεχόμενό του σε κορεσμένο λίπος (65). Αυτή η παρατήρηση πιθανά να συνδυάζεται με τη διαπίστωση ότι τα επιμέρους κορεσμένα λιπαρά οξέα εμφανίζουν διαφορετική δράση ως προς το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Είναι γνωστό ότι τα λιπαρά οξέα μικρής αλύσου και το στεατικό οξύ, που αποτελούν το 1/5 των λιπαρών οξέων του γάλακτος, δεν αυξάνουν τη χοληστερόλη (65). Συγκεκριμένα, το στεατικό χαμηλώνει την ολική και LDL χοληστερόλη αλλά όχι την HDL με αποτέλεσμα η συνολική του επίδραση να είναι θετική(65). Επίσης το λίπος του γάλακτος περιέχει και μικρή αλλά σημαντική ποσότητα ελαϊκού οξέος και μόνο το 14% των λιπαρών του οξέων έχει αποδειχθεί ότι ανεβάζει την χοληστερόλη, ενώ το 45% έχει φανεί να την μειώνει και το 41% είναι ουδέτερο(65). Τέλος, φαίνεται ότι είναι δυνατό τα πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα να χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση στο διαιτολόγιο χωρίς να ξεπερνιούνται τα όρια της συνιστώμενης πρόσληψης λίπους, αν συγχρόνως τηρούνται οι αρχές της ισορροπίας, της ποικιλίας και του μέτρου στις καθημερινές διατροφικές συνήθειες (66). Είναι πιθανό λοιπόν η κατανάλωση light τροφίμων να στερεί από τον οργανισμό ωφέλιμα θρεπτικά συστατικά, όπως η βιταμίνη E ή υποχοληστερολαιμικά λιπαρά οξέα, χωρίς να είναι απαραίτητο, εφόσον τηρείται το μέτρο την κατανάλωση των αντίστοιχων πλήρων προϊόντων.

Είναι σαφές από τα παραπάνω ότι το λίπος των τροφίμων περιέχει ποικιλία επιμέρους λιποειδών με διαφορετικές δράσεις στον οργανισμό, άλλοτε ωφέλιμες και άλλοτε όχι. Έχει φανεί ότι τα επιμέρους λιποειδή των τροφίμων υπεισέρχονται με πολλούς και ποικίλους τρόπους στη λειτουργία του οργανισμού, τροποποιώντας την ανάλογα. Ο προβληματισμός που προκύπτει από το δεδομένο αυτό και αξίζει περαιτέρω διερεύνηση είναι αν και κατά πόσο η απομάκρυνση τμήματος του λίπους ενός τροφίμου και γενικότερα η επεξεργασία του ώστε να μειωθεί η θερμιδική του αξία και το λιπαρό του περιεχόμενο, μεταβάλλει την ποσότητα και την ποιότητα των λιποειδών του κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να μεταβάλλεται και η συνολική βιολογική επίδρασή του στον οργανισμό. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του μπακαλιάρου που αναφέρθηκε παραπάνω που ενώ η θερμιδική αξία του τροφίμου και

η σύστασή του σε λίπος αυξήθηκε με το τηγάνισμα, το σύνολο των επιμέρους λιποειδών του φαίνεται ότι απέκτησε εντονότερη ικανότητα αναστολής της δράσης του PAF σε σχέση με τα λιποειδή του φρέσκου (50). Για την πληρέστερη εκτίμηση της διατροφικής αξίας των light τροφίμων δεν αρκεί ο υπολογισμός της θερμιδικής τους αξίας και της συνολικής ποσότητας του περιεχόμενου λίπους, αλλά απαιτείται και ο έλεγχος της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών τους. Έναν πρώτο ανιχνευτικό έλεγχο επιδιώκει να πραγματοποιήσει η μελέτη αυτή.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα τρόφιμα που αναλύθηκαν επιλέχθηκαν σαν τα πιο συχνά καταναλισκόμενα light προϊόντα από αυτά που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά, όπως καταγράφηκαν μετά από έρευνα αγοράς σε 2 ελληνικά super market.

Το πειραματικό μέρος της μελέτης αυτής περιλαμβάνει την απομόνωση των ολικών λιποειδών από τα επιλεγμένα τρόφιμα με τη μέθοδο της εκχύλισης ολικών λιποειδών κατά Bligh-Dyer. Στη συνέχεια μέρος αυτών των ολικών λιποειδών διαχωρίζονται σε ουδέτερα και πολικά με τη μέθοδο της κατανομής κατά αντιρροής. Τέλος τα ολικά, ουδέτερα και πολικά λιποειδή των τροφίμων (light και πλήρων) ελέγχονται ως προς τη βιολογική τους δραστηριότητα. Η βιολογική δοκιμασία περιλαμβάνει in vitro έλεγχο της συσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων από κουνέλια από τα απομονωμένα λιποειδή και έλεγχο της αναστολής της συσσωρευτικής δράσης του PAF σε αυτά.

1. Απομόνωση ολικών, ουδέτερων και πολικών λιποειδών

A. ΓΑΛΑ

I. ΓΑΛΑ ΠΛΗΡΕΣ

Το δείγμα του γάλατος που εξετάζεται είναι το συσκευασμένο πλήρες γάλα της ΔΕΛΤΑ. Σύμφωνα με τις πληροφορίες στη συσκευασία, η περιεκτικότητά του σε λίπος είναι:

Λιπαρά: 3,5%

Αρχικά παρελήφθησαν 150 γρ. δείγματος, ζυγισμένα με ογκομετρικό κύλινδρο, που σύμφωνα με τις πληροφορίες της συσκευασίας περιέχουν 5,25 γρ. ολικών λιποειδών.

Η υγρασία του πλήρους γάλακτος καταγράφεται στο βιβλίο των Βουδούρη-

Κοντομηνά «Χημεία τροφίμων» 77,5%, την οποία δεχόμαστε και χρησιμοποιούμε στους υπολογισμούς μας.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 150 γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 77,5%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 116,25 γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Α) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

- Τοποθετούμε τα 150 γρ. πλήρους γάλακτος προσεκτικά σε κωνική φιάλη, ώστε να μην υπάρχουν απώλειες.
- Με βάση την ποσότητα του τροφίμου, πραγματοποιείται το μονοφασικό σύστημα διαλυτών. Το σύστημα αυτό αποτελείται από χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v (α) (BLIGH-DYER).
- Χρησιμοποιώντας την ποσότητα του εξεταζόμενου δείγματος (150 γρ.) και γνωρίζοντας την περιεκτικότητα του τροφίμου και του δείγματος σε νερό, υπολογίζουμε τις απαιτούμενες ποσότητες χλωροφορμίου, μεθανόλης και νερού.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ: Σύμφωνα με την αναλογία (α) έχουμε:

Για 1 γρ. δείγματος 1 ml CHCl_3 : 2 ml CH_3OH : 0,8 ml H_2O

Για 150 γρ. δείγματος οι απαιτούμενες ποσότητες είναι:

CHCl_3 : 150 ml

CH_3OH : 300 ml

H_2O : 120 ml

Το δείγμα περιέχει ήδη 116,25 ml νερού, άρα χρειάζεται να προσθέσουμε

$120 - 116,25 = 3,75$ ml νερού.

Επομένως οι απαιτούμενες ποσότητες είναι:

CHCl_3 : 150 ml

CH_3OH : 300 ml

H_2O : 3,75 ml

Οι οποίες προστίθενται στην κωνική φιάλη.

- Γίνεται ανάδευση της κωνικής φιάλης, η οποία περιέχει το σύνολο των διαλυτών του μονοφασικού συστήματος και το τρόφιμο, για 30 – 45 min,

ώστε να επιτευχθεί η εκχύλιση από όλη τη μάζα του τροφίμου. Το μίγμα αφήνεται να ηρεμήσει για 15 min.

- Για τη δημιουργία του διφασικού συστήματος πρέπει η (α) να μετατραπεί σε CHCl_3 : CH_3OH : $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 1: 1: 0,9$ v/v/v (β). Αφού η CH_3OH είναι 300 ml, χρειάζεται η προσθήκη 150 ml CHCl_3 και 150 ml νερού.

Συνοπτικά:

CHCl ₃ : CH ₃ OH: H ₂ O				CHCl ₃ : CH ₃ OH: H ₂ O			
1	:	2	: 0,8 =>	1	:	1	:0,9
150	:	300	: 120 =>	300	:	300	: 270

Προσθήκη $\text{CHCl}_3 = 300 - 150 = 150$ ml

Προσθήκη $\text{H}_2\text{O} = 270 - 120 = 150$ ml

- Το όλον αναδεύεται, μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και παραμένει σε ηρεμία για 15 λεπτά, ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις (χλωροφορμική που περιέχει το σύνολο των λιποειδών και υδατομεθανολική που περιέχει πρωτεΐνες και υδατάνθρακες). Αφού ο διαχωρισμός των φάσεων έχει ολοκληρωθεί, παραλαμβάνεται σε εσφυρισμένη κωνική η χλωροφορμική φάση (κάτω φάση), η οποία μας ενδιαφέρει γιατί περιέχει το σύνολο των λιποειδών. Η χλωροφορμική φάση παραλαμβάνεται με προσοχή, ώστε να μην παρασυρθεί μαζί της μέρος της στιβάδας των μετουσιωμένων πρωτεϊνών του τροφίμου που βρίσκεται ανάμεσα στις δύο φάσεις.
- Η εσφυρισμένη κωνική τοποθετείται σε περιστρεφόμενη συσκευή απόσταξης υπό κενό (flash evaporator), για την εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου.
- Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές αναδιαλύσεις σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH , 1 : 1 (v/v) με μικρές ποσότητες κάθε φορά. Η ποσότητα του διαλύματος καθορίζεται από την ποσότητα των λαμβανόμενων λιποειδών.
- Μετά την αναδιάλυση το περιεχόμενο φυλάσσεται σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 1^α = 19,86 γρ. Οι διαλύτες εξατμίζονται μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου, οπότε στο σωλήνα περιέχεται συγκεντρωμένη η συνολική ποσότητα του εκχειλισμένου λίπους που μετά από ζύγιση προκύπτει

MAZA TL: 8,62 γρ. Η συνολική ποσότητα λίπους αναδιαλύεται σε μικρή ποσότητα διαλύματος CHCl_3 : CH_3OH , 1 : 1 (v/v) και χωρίζεται σε δύο ισόποσα μέρη. Το ένα φυλάσσεται στον προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 1^α για διαχωρισμό σε PL και NL και το άλλο μεταφέρεται σε άλλο βιδωτό σωλήνα 1^α TL βιολ. για τη βιολογική δοκιμασία.

MAZA TL: 8,62 γρ. => 4,31 γρ. (1^α) + 4,31 γρ. (1^α TL βιολ.).

Και οι δύο σωλήνες φυλάσσονται στο ψυγείο. Η μεγάλη ποσότητα λίπους που προκύπτει πιθανά να οφείλεται στο ότι το γάλα έχει την ιδιότητα να εγκλωβίζει υγρασία ή στην ταυτόχρονη λήψη μικρής ποσότητας μετουσιωμένης πρωτεΐνης μαζί με την χλωροφορμική φάση.

Β) ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

- Τα TL του ενός βιδωτού σωλήνα εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε άζωτο, για την απομάκρυνση των διαλυτών (CHCl_3 : CH_3OH).
- Για την κατανομή κατά αντιρροή χρειάζεται αιθανόλη 87%. Επειδή η αιθανόλη που διαθέταμε ήταν απόλυτη αιθανόλη (absolute ethanol) 100%, την αραιώσαμε με απεσταγμένο νερό για την επίτευξη αιθανόλης περιεκτικότητας 87% (EtOH).
- Η EtOH 87% προεξισορροπήθηκε με πετρελαϊκό αιθέρα (P. Eth) για την αποφυγή λαθεμένου διαχωρισμού σε NL και PL.
- Τα TL αναδιαλύονται σε 6 ml P. Eth, προεξισορροπημένου με 87% EtOH, σε δύο στάδια (3+3 ml), για την ποσοτική παραλαβή των λιποειδών. Σωλήνας 1^α = Σωλήνας Α.
- Σε δεύτερο καθαρό βιδωτό δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 6 ml P. Eth προεξισορροπημένου με 87% EtOH. Σωλήνας Β.
- Στο σωλήνα Α προστίθενται 4 ml EtOH 87%. Ο σωλήνας ανακινείται και αποσυμπιέζεται και παραμένει σε ηρεμία για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων (P. Eth - EtOH).
- Μετά τον διαχωρισμό παραλαμβάνεται η κάτω φάση (EtOH) με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται στο σωλήνα Β. Αναδεύουμε και αποσυμπιέζουμε και περιμένουμε για το διαχωρισμό των φάσεων.
- Μετά το διαχωρισμό παραλαμβάνουμε την κάτω αιθανολική φάση σε εσφυρισμένη κωνική, η οποία εντέλει περιέχει τα PL.

- Η προσθήκη 4 ml EtOH 87% στο σωλήνα Α και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές.
- Στο σωλήνα Β συγκεντρώνονται τα 6 +6 ml του P. Eth, ο οποίος πλέον περιέχει τα NL.
- Σε περιστρεφόμενη συσκευή απόσταξης υπό κενό (flash evaporator) γίνεται εξάτμιση μέχρι ξηρού της εσφυρισμένης κωνικής φιάλης με την αιθανόλη και τα PL.
- Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές αναδιαλύσεις σε διάλυμα CHCl₃: CH₃OH (1 : 1) v/v, με διαδοχικές ποσότητες και το διάλυμα που παραλαμβάνεται μεταφέρεται σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 1^α PL βιολ και φυλάσσεται στο ψυγείο.
- Τα 12 ml του P. Eth με τα NL εξατμίζονται με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και αναδιαλύονται σε μικρή, γνωστή ποσότητα CHCl₃: CH₃OH (1 : 1) v/v και φυλάσσονται στο ψυγείο για την βιολογική δοκιμασία.
- Το διάλυμα στο σωλήνα 1αPL εξατμίζεται με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζυγίζεται ώστε να υπολογισθεί το βάρος των PL του δείγματος. Στη συνέχεια αναδιαλύεται σε μικρότερη και γνωστή ποσότητα CHCl₃: CH₃OH (1 : 1) v/v και φυλάσσεται στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή του τροφίμου βρίσκονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες.

1. Στον 1αTL 4,31γρ ολικών λιποειδών
2. Στον σωλήνα 1αNL 4,03γρ ουδέτερων λιποειδών
3. Στον σωλήνα 1αPL 0,28γρ πολικών λιποειδών.

II. ΓΑΛΑ ΗΜΙΠΑΧΟ

Το δείγμα του γάλατος που εξετάζεται είναι το συσκευασμένο ημίπαχο γάλα της ΔΕΛΤΑ. Σύμφωνα με τις πληροφορίες στη συσκευασία, η περιεκτικότητά του σε λίπος είναι:

Λιπαρά: 1,5%

A. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα τροφίμου ως προς το πλήρες:

Αρχικά παρελήφθησαν 152 γρ. δείγματος (150ml), ζυγισμένα με ογκομετρικό κύλινδρο, που σύμφωνα με τις πληροφορίες της συσκευασίας περιέχουν 2,25 γρ. ολικών λιποειδών. Η ποσότητα του γάλακτος σε αυτή την περίπτωση είναι ίση με την αντίστοιχη του πλήρους γάλακτος και ισούται με 150 ml. Η υγρασία του ημίπαχου γάλακτος υπολογίζεται από την υγρασία του πλήρους, αφού αφαιρεθεί η επιπλέον ποσότητα λίπους που υπάρχει στο πλήρες γάλα και αντικατασταθεί με νερό, οπότε προκύπτει $77,5\% + 2\% = 79,5\%$.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 152 γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 79,5%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 121 γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (152ml CHCl_3 , 304ml CH_3OH , $121,6 - 121 = 0,6\text{ml H}_2\text{O}$).
- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 1: 1: 0,9$ v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (152ml και 152ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων

- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 1βTL = 19,9γρ.
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 1,789γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 1βTL και ένα νέο 1βTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 0,89γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

Β)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 1βTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. Και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 1βTL (Α).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα Α, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).
- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα Β με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα Β, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα Α και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.

- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 1βPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 1βNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 1βPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 150ml του ημίπαχου γάλακτος περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

1. Ο σωλήνας 1βTLβιολ. => 0,89gr ολικών λιποειδών
2. Ο σωλήνας 1βPL => 0,4gr πολικών λιποειδών
3. Ο σωλήνας 1βNL => 0,49gr ουδέτερων λιποειδών.

B. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα λιπαρών ως προς το πλήρες:

Υπολογίζεται η ποσότητα ημίπαχου γάλακτος που μας δίνει την ίδια ποσότητα ολικών λιποειδών με τα 150ml του πλήρους γάλακτος, οπότε προκύπτει ότι πρέπει να πάρουμε 350 ml ημίπαχου γάλακτος ΔΕΛΤΑ που αντιστοιχεί σε 355γρ. δείγματος.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 355γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 79,5%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 282,2 γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη των 2 λίτρων,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την

περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (355ml CHCl_3 , 710ml CH_3OH , 284-282,2=1,8 ml H_2O).

- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 1: 1: 0,9$ v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (355ml και 355ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη των 2 λίτρων, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 1γTL = 19,9γρ.
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 4,974γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 1γTL και ένα νέο 1γTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 2,487γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

Β)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 1γTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 1γTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).

- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 1γPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 1γNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 1γPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 350ml του ημίπαχου γάλακτος περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

1. Ο σωλήνας 1γTLβιολ. $\Rightarrow$ 2,487gr ολικών λιποειδών
2. Ο σωλήνας 1γPL $\Rightarrow$ 0,172gr πολικών λιποειδών
3. Ο σωλήνας 1γNL $\Rightarrow$ 2,315gr ουδέτερων λιποειδών.

B. ΓΙΑΟΥΡΤΙ

I. ΓΙΑΟΥΡΤΙ ΠΛΗΡΕΣ

Για την εξέταση επιλέγεται το γιαούρτι Harmony της ΜΕΒΓΑΛ το οποίο σύμφωνα με τις πληροφορίες στην ετικέτα έχει την εξής περιεκτικότητα:

ΛΙΠΟΣ: 10%

ΟΛΙΚΑ ΣΤΕΡΕΑ: 19,5%

ΥΓΡΑΣΙΑ: 80,5%

Για τη μέτρηση ελήφθησαν 60 γρ. γιαουρτιού μετά από ζύγιση που σύμφωνα με τη συσκευασία περιέχουν 6 γρ. ολικών λιποειδών.

Από τις πληροφορίες της ετικέτας προκύπτουν τα παρακάτω στοιχεία:

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 60γρ

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 80,5%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 48,3γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (60ml CHCl_3 , 120ml CH_3OH , 48 - 48,3= -0,3ml H_2O).
- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : H_2O => 1: 1: 0,9 v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (60ml και 60ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 2αTL .
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 1,45γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 2αTL και ένα νέο 2αTLβιολ. Στον κάθε

ένα περιέχονται από 0,725γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

Β)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 2αTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. Και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 2αTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).
- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 2αPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 2αNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 2αPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 60gr του πλήρους γιαουρτιού περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

- 1.Ο σωλήνας 2αTLβιολ. $\Rightarrow$ 0,725gr ολικών λιποειδών
- 2.Ο σωλήνας 2αPL $\Rightarrow$ 0,135gr πολικών λιποειδών
- 3.Ο σωλήνας 2αNL $\Rightarrow$ 0,59gr ουδέτερων λιποειδών.

II. ΓΙΑΟΥΡΤΙ LIGHT

Μελετήθηκε το γιαούρτι Harmony της ΜΕΒΓΑΛ που είναι χαμηλό σε λιπαρά και σύμφωνα με τις πληροφορίες στη συσκευασία η περιεκτικότητά του είναι:

ΛΙΠΑΡΑ: 1%

ΟΛΙΚΑ ΣΤΕΡΕΑ: 14,5%

ΥΓΡΑΣΙΑ: 85,5%

A. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα τροφίμου ως προς το πλήρες:

Αρχικά παρελήφθησαν 60 gr. δείγματος, ζυγισμένα με κωνική φιάλη, που σύμφωνα με τις πληροφορίες της συσκευασίας περιέχουν 0,6gr. ολικών λιποειδών. Η ποσότητα του γιαουρτιού σε αυτή την περίπτωση είναι ίση με την αντίστοιχη του πλήρους γιαουρτιού.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 60 gr.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 85,5%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 51,3 gr.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα

του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (60ml CHCl_3 , 120ml CH_3OH , 51,3- 48=3,3ml H_2O).

- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 1: 1: 0,9$ v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (60ml και 60ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 2βTL.
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 2,18γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 2βTL και ένα νέο 2βTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 1,09γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

Β)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 2βTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. Και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 2βTL (Α).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα Α, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).

- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 2βPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 2βNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 2βPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 60γρ του ημίπαχου γιαουρτιού περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

1.Ο σωλήνας 2βTLβιολ.=> 1,09gr ολικών λιποειδών

2.Ο σωλήνας 2βPL=> 0,41gr πολικών λιποειδών

3.Ο σωλήνας 2βNL=> 0,68gr ουδέτερων λιποειδών

B. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα λιπαρών ως προς το πλήρες:

Υπολογίζεται η ποσότητα ημίπαχου γιαουρτιού που μας δίνει την ίδια ποσότητα ολικών λιποειδών με τα 60γρ του πλήρους γιαουρτιού, οπότε προκύπτει ότι πρέπει να πάρουμε 600γρ.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 600γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 85,5 %

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ:513 γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη των 2 λίτρων,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (600ml CHCl_3 , 1200ml CH_3OH , 480-513= - 33 ml H_2O).
- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : H_2O => 1: 1: 0,9 v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (600ml και 600 – 33= 567ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά 1000ml του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη των 2 λίτρων, ανάδευση.
- Σπάει η διαχωριστική χοάνη των 2 λίτρων και μου μένουν 1313 ml του διφασικού μίγματος.
- Το υπόλοιπο του μίγματος βρίσκεται σε κωνική φιάλη και ψύχεται για καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων, οπότε προκύπτει καθαρή υδατομεθανολική φάση και «χιονισμένη» χλωροφορμική λόγω της μεγάλης ποσότητας μετουσιωμένης πρωτεΐνης.
- Δημιουργώ κενό με αναρρόφηση και απομακρύνω την άνω υδατομεθανολική φάση.
- Το υπόλοιπο του μίγματος φυγοκεντρείται στις 2000στρ./min. για 10 min οπότε παίρνω δύο υγρές, διαυγείς φάσεις που χωρίζονται από μία λεπτή συμπαγή στρώση μετουσιωμένης πρωτεΐνης.
- Παραλαβή οι δύο υγρές φάσεις και πετιέται η μετουσιωμένη πρωτεΐνη,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 2γTL.

- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 6,78γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 2γTL και ένα νέο 2γTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 3,39γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

B)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 2γTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 2γTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).
- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 2γPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 2γNL.

- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 2γPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl_3 : CH_3OH : (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 600gr του ημίπαχου γιαουρτιού περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

- 1.Ο σωλήνας 2γTLβιολ. $\Rightarrow$ 3,39gr ολικών λιποειδών
- 2.Ο σωλήνας 2γPL $\Rightarrow$ 0,483gr πολικών λιποειδών
- 3.Ο σωλήνας 2γNL $\Rightarrow$ 2,907gr ουδέτερων λιποειδών.

Γ. ΜΑΡΓΑΡΙΝΗ

Ι. ΜΑΡΓΑΡΙΝΗ ΠΛΗΡΗΣ

Το δείγμα είναι η μαργαρίνη Βιτάμ soft της οποίας η συσκευασία δίνει την περιεκτικότητα σε λιπαρά:

Λιπαρά: 70%

Η υγρασία θεωρείται γνωστή από τη βιβλιογραφία και ίση με 10% κατά εκτίμηση.

Ζυγίζονται 7 gr μαργαρίνης σε μικρή κωνική φιάλη, όπου σύμφωνα με τη συσκευασία περιέχονται 4,9gr ολικών λιποειδών . Οπότε έχουμε:

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 7gr

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 10%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 0,7gr

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την

περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (7ml CHCl_3 , 14ml CH_3OH , 5,6-0,7= 4,9 ml H_2O).

- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 1: 1: 0,9$ v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (7ml και 7ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 3αTL .
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 5,1γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 3αTL και ένα νέο 3αTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 2,55γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

B)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 3αTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. Και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 3αTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).

- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 3αPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 3αNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 3αPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 7 γρ της πλήρους μαργαρίνης περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

- 1.Ο σωλήνας 3αTLβιολ. $\Rightarrow$ 2,55gr ολικών λιποειδών
- 2.Ο σωλήνας 3αPL $\Rightarrow$ 0,112gr πολικών λιποειδών
- 3.Ο σωλήνας 3αNL $\Rightarrow$ 2,438 gr ουδέτερων λιποειδών.

II. ΜΑΡΓΑΡΙΝΗ LIGHT

Το δείγμα είναι η μαργαρίνη Βιτάμ soft light με περιεκτικότητα σε λιπαρά 60%. Η διαφορά περιεκτικότητας σε σχέση με την πλήρη θεωρείται ότι αντιστοιχεί και στην αύξηση της υγρασίας του light τροφίμου στο 20%.

A. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα τροφίμου ως προς το πλήρες:

Αρχικά παρελήφθησαν 7 γρ. δείγματος , ζυγισμένα με κωνική φιάλη, που σύμφωνα με τις πληροφορίες της συσκευασίας περιέχουν 4,2γρ. ολικών λιποειδών. Η ποσότητα

της μαργαρίνης σε αυτή την περίπτωση είναι ίση με την αντίστοιχη της light μαργαρίνης.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 7 γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 20%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 1,4 γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Α) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (7ml CHCl_3 , 14ml CH_3OH , 5,6 – 1,4 = 4,2 ml H_2O).
- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : H_2O => 1: 1: 0,9 v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (7ml και 7ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 3βTL.
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 3,66γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 3βTL και ένα νέο 3βTLβιολ. Στον κάθε

ένα περιέχονται από 1,83γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

Β)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 3βTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. Και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 3βTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).
- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 3βPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 3βNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 3βPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 7γρ της light μαργαρίνης περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

1.Ο σωλήνας 3βTLβιολ. $\Rightarrow$ 1,8315gr ολικών λιποειδών

2.Ο σωλήνας 3βPL $\Rightarrow$ 0,192gr πολικών λιποειδών

3.Ο σωλήνας 3βNL $\Rightarrow$ 1,64 gr ουδέτερων λιποειδών.

B. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα λιπαρών ως προς το πλήρες:

Υπολογίζεται η ποσότητα της light μαργαρίνης που μας δίνει την ίδια ποσότητα ολικών λιποειδών με τα 7γρ της πλήρους μαργαρίνης, οπότε προκύπτει ότι πρέπει να πάρουμε 8,3γρ.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 8,3γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 20%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 1,66γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (8,3ml CHCl_3 , 16,6ml CH_3OH , 6,64 – 1,66= 4,98 ml H_2O).
- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow$ 1: 1: 0,9 v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (8,3ml και 8,3ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων

- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 3γTL.
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 5,246γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 3γTL και ένα νέο 3γTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 2,623γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

B)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 3γTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 3γTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).
- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.

- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 3γPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 3γNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 3γPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 8,3γρ από την light μαργαρίνη περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

- 1.Ο σωλήνας 3γTLβιολ.=> 2,623gr ολικών λιποειδών
- 2.Ο σωλήνας 3γPL=> 0,079gr πολικών λιποειδών
- 3.Ο σωλήνας 3γNL=> 2,544gr ουδέτερων λιποειδών.

Δ. ΚΑΣΕΡΙ

Ι. ΚΑΣΕΡΙ ΠΛΗΡΕΣ ΣΕ ΛΙΠΑΡΑ

Το δείγμα είναι το κασέρι Τρικαλινό του οποίου η συσκευασία μας παρέχει τις εξής πληροφορίες:

ΛΙΠΑΡΑ ΕΠΙ ΞΗΡΟΥ: 42%

ΜΕΓΙΣΤΗ ΥΓΡΑΣΙΑ: 46%

Τα λιπαρά επί του συνολικού τροφίμου υπολογίζονται από τα παραπάνω αν ως πραγματική υγρασία θεωρηθεί η μέγιστη, οπότε προκύπτει:

ΛΙΠΑΡΑ ΕΠΙ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 29%.

Ζυγίζονται 17,4 γρ τροφίμου που σύμφωνα με τις πληροφορίες της συσκευασίας περιέχουν 5 γρ ολικών λιποειδών, οπότε έχουμε:

ΒΑΡΟΣ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 17,4γρ

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 46%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 3,4γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Η ζυγισμένη ποσότητα κασεριού τοποθετείται στο δοχείο ενός μίξερ μαζί με μικρή, συγκεκριμένη ποσότητα μεθανόλης (10ml) και αλέθεται με τη βοήθεια του μίξερ.
- Το αλεσμένο κασέρι μαζί με την μεθανόλη μεταφέρεται σε γουδί και λειοτριβείται με το γουδοχέρι.
- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,

Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (17,4ml CHCl_3 , 34,8 – 10=24,8 ml CH_3OH , 13,92- 3,4= 10,52 ml H_2O).

- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : H_2O => 1: 1: 0,9 v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (17,4ml και 17,4ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 4αTL .
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 2,5γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 4αTL και ένα νέο 4αTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 1,25γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

B)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 4αTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. Και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 4αTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).
- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 4αPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 4αNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 4αPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 17,4 γρ από το πλήρες κασέρι περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

- 1.Ο σωλήνας 4αTLβιολ.=> 1,25gr ολικών λιποειδών
- 2.Ο σωλήνας 4αPL=> 0,154gr πολικών λιποειδών
- 3.Ο σωλήνας 4αNL=> 1,096 gr ουδέτερων λιποειδών.

II. ΚΑΣΕΡΙ ΧΑΜΗΛΟ ΣΕ ΛΙΠΑΡΑ

Το δείγμα είναι το κασέρι Τρικαλινό light του οποίου η συσκευασία μας παρέχει τις εξής πληροφορίες:

ΛΙΠΑΡΑ ΕΠΙ ΞΗΡΟΥ: 21%

ΜΕΓΙΣΤΗ ΥΓΡΑΣΙΑ: 52,4%

Η περιεκτικότητα του συνολικού τροφίμου σε λιπαρά υπολογίζεται από τα παραπάνω στοιχεία, αν ως πραγματική υγρασία θεωρηθεί η μέγιστη, οπότε προκύπτει:

ΛΙΠΑΡΑ ΕΠΙ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 14%

A. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα τροφίμου ως προς το πλήρες:

Αρχικά παρελήφθησαν με ζύγιση 17,4 γρ. δείγματος, ζυγισμένα με κωνική φιάλη, που σύμφωνα με τις πληροφορίες της συσκευασίας περιέχουν 3,65γρ. ολικών λιποειδών. Η ποσότητα του κασεριού σε αυτή την περίπτωση είναι ίση με την αντίστοιχη του πλήρους κασεριού.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 17,4 γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 52,4%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 9,12 γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Η ζυγισμένη ποσότητα κασεριού τοποθετείται στο δοχείο ενός μίξερ μαζί με μικρή, συγκεκριμένη ποσότητα μεθανόλης (10ml) και αλέθεται με τη βοήθεια του μίξερ.
- Το αλεσμένο κασέρι μαζί με την μεθανόλη μεταφέρεται σε γουδί και λειοτριβείται με το γουδοχέρι.
- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να

καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (17,4ml CHCl₃, 34,8- 10=24,8ml CH₃OH, 13,6 – 9,12= 4,7 ml H₂O).

- Ανάδευση για 30-45 min,

Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl₃: CH₃OH: H₂O=> 1: 1: 0,9 v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl₃ και H₂O που πρέπει να προστεθούν (17,4ml και 17,4ml αντίστοιχα).

- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 4βTL.
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 1,445γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 4βTL και ένα νέο 4βTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 0,7225γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

Β)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 4βTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. Και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 4βTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).

- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 4βPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 4βNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 4βPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 17,4γρ του light κασεριού περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

- 1.Ο σωλήνας 4βTLβιολ. $\Rightarrow$ 0,7225gr ολικών λιποειδών
- 2.Ο σωλήνας 4βPL $\Rightarrow$ 0,24gr πολικών λιποειδών
- 3.Ο σωλήνας 4βNL $\Rightarrow$ 0,48 gr ουδέτερων λιποειδών.

B. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα λιπαρών ως προς το πλήρες:

Υπολογίζεται η ποσότητα από το light κασέρι που μας δίνει την ίδια ποσότητα ολικών λιποειδών με τα 17,4γρ του πλήρους , οπότε προκύπτει ότι πρέπει να πάρουμε 36γρ.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 36γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 52,4%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 18,9γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Η ζυγισμένη ποσότητα κασεριού τοποθετείται στο δοχείο ενός μίξερ μαζί με μικρή, συγκεκριμένη ποσότητα μεθανόλης (10ml) και αλέθεται με τη βοήθεια του μίξερ.
- Το αλεσμένο κασέρι μαζί με την μεθανόλη μεταφέρεται σε γουδί και λειοτριβείται με το γουδοχέρι
- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (36ml CHCl_3 , $72 - 10 = 62\text{ml}$ CH_3OH , $28,8 - 18,9 = 9,9\text{ ml}$ H_2O).
- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 1: 1: 0,9$ v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (36ml και 36ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 4γTL.
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 2,352γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 4γTL και ένα νέο 4γTLβιολ. Στον κάθε

ένα περιέχονται από 1,176γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

Β)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 4γTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 4γTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).
- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 4γPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 4γNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 4γPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 36γρ από το light κασέρι περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

1.Ο σωλήνας 4γTLβιολ.=> 2,352gr ολικών λιποειδών

2.Ο σωλήνας 4γPL=> 0,143gr πολικών λιποειδών

3.Ο σωλήνας 4γNL=> 1,033gr ουδέτερων λιποειδών.

E. ZAMPION

I. ZAMPION ΠΛΗΡΕΣ

Το δείγμα είναι το πλήρες ζαμπόν Υφαντής που βρίσκεται σε μεγάλες συσκευασίες στην αγορά και τεμαχίζεται στις επιθυμητές ποσότητες από τους πωλητές. Η περιεκτικότητά του σε λίπος είναι άγνωστη, αφού σύμφωνα με τον πωλητή δεν αναγράφεται στη συσκευασία. Η υγρασία του τροφίμου είναι επίσης άγνωστη.

Γι' αυτό ζυγίζεται ποσότητα τροφίμου ίση με 50γρ και η υγρασία θεωρείται περίπου 60%, οπότε το περιεχόμενό του σε νερό είναι περίπου 30γρ.

MAZA ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 50γρ

MAZA ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 30γρ

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

- Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,
- Η ζυγισμένη ποσότητα τροφίμου τοποθετείται στο δοχείο ενός μίξερ μαζί με μικρή, συγκεκριμένη ποσότητα μεθανόλης (20ml) και αλέθεται με τη βοήθεια του μίξερ.
- Το αλεσμένο κασέρι μαζί με την μεθανόλη μεταφέρεται σε γουδί και λειοτριβείται με το γουδοχέρι.
- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να

καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (50ml CHCl₃, 100 – 20=80 ml CH₃OH, 40 - 30= 10 ml H₂O).

- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl₃: CH₃OH: H₂O => 1: 1: 0,9 v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl₃ και H₂O που πρέπει να προστεθούν (50ml και 50ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 5αTL .
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 1,36γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 5αTL και ένα νέο 5αTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 0,68γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

B)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 5αTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. Και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 5αTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).

- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 5αPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 5αNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 5αPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 50γρ από το πλήρες κασέρι περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

- 1.Ο σωλήνας 5αTLβιολ.=> 0,68gr ολικών λιποειδών
- 2.Ο σωλήνας 5αPL=> 0,521gr πολικών λιποειδών
- 3.Ο σωλήνας 5αNL=> 0,159 gr ουδέτερων λιποειδών

Παρατηρούμε ότι σε αντίθεση με την πλειοψηφία των τροφίμων, το ζαμπόν έχει περισσότερα πολικά από ότι ουδέτερα λιποειδή. Επειδή αυτό το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα σπάνιο, είναι πιθανό να έχει γίνει κάποιο λάθος πειραματικό στην κατανομή κατά αντιρροή.

II. ZAMPION LIGHT

Το δείγμα είναι το ζαμπόν light Υφαντής που βρίσκεται σε μεγάλες συσκευασίες στην αγορά και τεμαχίζεται από τους πωλητές ανάλογα με τις επιθυμίες του καταναλωτή. Από τις πληροφορίες της συσκευασίας γνωρίζουμε ότι η περιεκτικότητά του σε λιπαρά είναι 2%, αλλά η υγρασία του είναι άγνωστη, οπότε θεωρείται κοινή με την υγρασία του πλήρους τροφίμου.

ΛΙΠΑΡΑ:2%

ΥΓΡΑΣΙΑ: 60%

A. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα τροφίμου ως προς το πλήρες:

Αρχικά παρελήφθησαν με ζύγιση 50 γρ. δείγματος, ζυγισμένα σε κωνική φιάλη, που σύμφωνα με τις πληροφορίες της συσκευασίας περιέχουν 1γρ. ολικών λιποειδών. Η ποσότητα του κασεριού σε αυτή την περίπτωση είναι ίση με την αντίστοιχη του πλήρους κασεριού.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ:50 γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ:60%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ:30 γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Η ζυγισμένη ποσότητα κασεριού τοποθετείται στο δοχείο ενός μίξερ μαζί με μικρή, συγκεκριμένη ποσότητα μεθανόλης (20ml) και αλέθεται με τη βοήθεια του μίξερ.
- Το αλεσμένο κασέρι μαζί με την μεθανόλη μεταφέρεται σε γουδί και λειοτριβείται με το γουδοχέρι.
- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (50ml CHCl_3 , 100- 20=80ml CH_3OH , 40-30= 10 ml H_2O).
- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : H_2O => 1: 1: 0,9 v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (50ml και 50ml αντίστοιχα).

- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 5βTL.
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 0,496γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 5βTL και ένα νέο 5βTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 0,248γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

Β)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΡΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 5βTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. Και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 5βTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).
- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.

- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα Α και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 5βPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 5βNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 5βPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 50γρ του light κασεριού περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

- 1.Ο σωλήνας 5βTLβιολ.=> 0,248gr ολικών λιποειδών
- 2.Ο σωλήνας 5βPL=> 0,316gr πολικών λιποειδών
- 3.Ο σωλήνας 5βNL=>- gr ουδέτερων λιποειδών.

Είναι σαφές ότι έχει γίνει κάποιο λάθος στην κατανομή κατά αντιρροή, λόγω της πολύ μικρής ποσότητας ολικού λίπους. Γι' αυτό για τη βιολογική δοκιμασία θα πάρουμε λίπος από τα 5γ σωληνάκια.

B. Εξέταση δείγματος με κοινή ποσότητα λιπαρών ως προς το πλήρες:

Υπολογίζεται η ποσότητα από το light τροφίμου που μας δίνει την ίδια ποσότητα ολικών λιποειδών με τα 50γρ του πλήρους, οπότε προκύπτει ότι πρέπει να πάρουμε 150γρ. Αφού από τα 100γρ light τροφίμου πρακτικά παίρνουμε 1 γρ ολικών λιποειδών λόγω απωλειών, για να πάρουμε 1,5 γρ λίπους θα πρέπει να ζυγίσουμε και να χρησιμοποιήσουμε 150γρ ζαμπόν.

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 150γρ.

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 60%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 90γρ.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

A) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ BLIGH-DYER

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε λεπτομερώς στην εκχύλιση των ολικών λιποειδών του πλήρους γάλακτος. Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Η ζυγισμένη ποσότητα κασεριού τοποθετείται στο δοχείο ενός μίξερ μαζί με συγκεκριμένη ποσότητα μεθανόλης (100ml) και αλέθεται με τη βοήθεια του μίξερ.
- Το αλεσμένο κασέρι μαζί με την μεθανόλη μεταφέρεται σε γουδί και λειοτριβείται με το γουδοχέρι
- Τοποθέτηση του δείγματος σε κωνική φιάλη,
- Παρασκευή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών, χλωροφόρμιο (CHCl_3), μεθανόλη (CH_3OH) και νερό (H_2O) με αναλογία 1:2:0,8 v/v/v και υπολογισμός των απαιτούμενων ποσοτήτων διαλυτών με βάση την ποσότητα του τροφίμου. Η προσθήκη επιπλέον νερού γίνεται σύμφωνα με την περιεχόμενη ποσότητα νερού στη μάζα του προς εξέταση τροφίμου, ώστε να καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία (150ml CHCl_3 , $300 - 100 = 200\text{ml}$ CH_3OH , $120 - 90 = 30\text{ ml}$ H_2O).
- Ανάδευση για 30-45 min,
- Μετατροπή του μονοφασικού συστήματος διαλυτών σε διφασικό, CHCl_3 : CH_3OH : $\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 1: 1: 0,9$ v/v/v και υπολογισμό των απαιτούμενων ποσοτήτων CHCl_3 και H_2O που πρέπει να προστεθούν (150ml και 150ml αντίστοιχα).
- Μεταφορά του μίγματος σε διαχωριστική χοάνη, ανάδευση και αναμονή για διαχωρισμό των φάσεων
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης που περιέχει τα TL,
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού του διαλυτικού μέσου σε flash evaporator,
- Αναδιάλυση των λιποειδών σε διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v)
- Λήψη των TL και φύλαξή τους σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 5γTL.
- Εξάτμιση διαλυτών με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ζύγιση της ποσότητας των ολικών λιποειδών :Μάζα TL= 3,92γρ.
- Αναδιάλυση των TL σε CHCl_3 : CH_3OH (1:1 v/v) και ισόποσος διαχωρισμός τους σε δύο βιδωτούς σωλήνες, τον 5γTL και ένα νέο 5γTLβιολ. Στον κάθε ένα περιέχονται από 1,96γρ. ολικών λιποειδών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατανομή κατά αντιρροή και τη βιολογική δοκιμασία αντίστοιχα.

Β)ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤΑ ΑΝΤΙΠΡΟΗ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που ακολουθείται στο διαχωρισμό των λιποειδών του πλήρους γάλακτος..

Συνοπτικά φαίνεται παρακάτω,

- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε άζωτο των TL που περιέχονται στον σωλήνα 5γTL.
- Προεξισορρόπηση των διαλυτών (P. Eth. και EtOH).
- Αναδιάλυση των λιποειδών με 6 ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα στο σωλήνα 5γTL (A).
- Προσθήκη 4ml EtOH 87% στο σωλήνα A, ανάδευση, αποσυμπίεση και παραμονή για το διαχωρισμό των δύο φάσεων (πετρελαϊκής με τα NL και αιθανολικής με τα PL).
- Παραλαβή με πιπέτα Pasteur της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε βιδωτό σωλήνα B με 6ml προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα .
- Ανάδευση του σωλήνα B, αποσυμπίεση και παραμονή για διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω αιθανολικής φάσης και μεταφορά της σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη.
- Η προσθήκη 4ml αιθανόλης 87% στο σωλήνα A και τα επόμενα στάδια επαναλαμβάνονται 7 φορές ακόμα.
- Συλλογή της αιθανολικής φάσης στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξάτμιση σε flash evaporator μέχρι ξηρού και αναδιάλυση με CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και μεταφορά σε προζυγισμένο βιδωτό σωλήνα 5γPL.
- Συλλογή των 12 ml πετρελαϊκού αιθέρα σε βιδωτό σωλήνα 5γNL.
- Εξάτμιση των διαλυτών των δύο σωλήνων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού, ζύγιση του 5γPL και αναδιάλυση του περιεχομένου τους σε CHCl₃: CH₃OH (1:1 v/v) και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τελικά τα λιποειδή από τα 150gr από το light κασέρι περιέχονται σε 3 βιδωτούς σωλήνες:

1.Ο σωλήνας 5γTLβιολ.=> 1,96gr ολικών λιποειδών

2.Ο σωλήνας 5γPL=> 0,478gr πολικών λιποειδών

3.Ο σωλήνας 5γNL=> 1,48gr ουδέτερων λιποειδών.

Παρατηρούμε ότι για το ζαμπόν light τα ουδέτερα είναι περισσότερα από τα πολικά όπως συμβαίνει και στην πλειοψηφία των τροφίμων. Η διαφορά με το πλήρες τρόφιμο είτε οφείλεται σε λάθος πειραματικό στην περίπτωση του πλήρους τροφίμου, είτε είναι αποτέλεσμα της επεξεργασίας που υφίσταται το ζαμπόν.

Οι ποσότητες των λιποειδών από όλα τα δείγματα συγκεντρώνονται σε πίνακα του Παραρτήματος.

2. Βιολογικό πείραμα

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η βιολογική δοκιμασία πρέπει να απομονωθεί πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια από αίμα κουνελιών, ώστε να γίνει μια πρώτη in vitro δοκιμασία της βιολογικής δραστηριότητας των απομονωμένων λιποειδών από τα τρόφιμα (κανονικά και light). Θα συγκριθεί η συσσώρευση που προκαλούν τα λιποειδή στα αιμοπετάλια καθώς και η επίδρασή τους στη δράση του PAF (παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων) στα αιμοπετάλια.

A. Απομόνωση αιμοπεταλίων από κουνέλια

- 1) Επιλέγουμε το κουνέλι από το οποίο θα πάρουμε αίμα, το βάζουμε στην ειδική θέση και παίρνουμε αίμα από το ένα αυτί του που συλλέγεται σε δύο πλαστικούς και όχι γυάλινους σωλήνες, ώστε να μην προκληθεί θρόμβωση των αιμοπεταλίων.
- 2) Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε σε υπερφυγόκεντρο στις 1500 στροφές / min για 15 λεπτά αφού έχει προστεθεί κατάλληλη ποσότητα αντιδραστηρίου ACD που δρα ως αντιπηκτικό. Αφού τελειώσει η πρώτη φυγοκέντρηση, διακρίνουμε 2 στιβάδες: Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια PRP στο πάνω μέρος του σωλήνα και τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος, κυρίως τα ερυθρά αιμοσφαίρια στο κάτω μέρος του σωλήνα.
- 3) Παραλαμβάνουμε με προσοχή την κάτω στιβάδα και την απομακρύνουμε και στο σωλήνα μένει μόνο το PRP.
- 4) Σε 4 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτω αρχικά 2 ml ficole pack που λειτουργεί σα μονωτικό για τους κραδασμούς που υφίστανται τα αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης.

- 5) Στους 4 σωλήνες κατανέμεται το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια που προέκυψε από την πρώτη φυγοκέντρωση. Η μεταφορά γίνεται με ειδικό πλαστικό σιφώνιο και με πολύ αργές, μαλακές κινήσεις, ώστε να μην προκληθεί βλάβη των αιμοπεταλίων. Κατά τη μεταφορά είναι πιθανό να παρασυρθεί μικρή ποσότητα ερυθροκυττάρων, γεγονός που δε μας ανησυχεί γιατί θα απομακρυνθούν στις επόμενες φυγοκεντρήσεις.
- 6) Οι 4 σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 2800 στροφές/min για 20 min. Αφού τελειώσει η 2^η φυγοκέντρωση διακρίνουμε 3 φάσεις στον κάθε σωλήνα: Πάνω βρίσκεται το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP), ενδιάμεσα σε μία λεπτή στρώση φαίνονται τα αιμοπετάλια, και κάτω το στρώμα του ficole pack, ενώ στον πυθμένα διακρίνεται μια μικρή κόκκινη κουκίδα που είναι τα παρασυρμένα ερυθροκύτταρα.
- 7) Παραλαμβάνεται με τον ίδιο τρόπο η στιβάδα των πλυμένων αιμοπεταλίων.
- 8) Σε 4 νέους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν από 2 ml ficole pack και μεταφέρεται η αναδιαλυμένη σε TG- EGTA, στιβάδα των αιμοπεταλίων από την προηγούμενη φυγοκέντρωση με πλαστικό σιφώνιο και με τον ίδιο προσεκτικό τρόπο. Αυτή τη φορά σε κάθε σωλήνα η συνολική ποσότητα διαλύματος αιμοπεταλίων και ficole pack δεν ξεπερνά τα 7 ml συνολικά γιατί τώρα το διάλυμα των αιμοπεταλίων είναι πιο πυκνό.
- 9) Οι 4 σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 2800 στροφές/ min για 15 min. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης διακρίνονται πάλι οι 3 φάσεις της προηγούμενης φυγοκέντρωσης.
- 10) Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τις προηγούμενες φυγοκεντρήσεις και γίνεται τελευταία φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές/ min για 15 min. Αυτή τη φορά δε χρησιμοποιείται ficole pack και τα αιμοπετάλια αναδιαλύονται σε διάλυμα TG.
- 11) Μετά το τέλος της 4^{ης} φυγοκέντρωσης τα αιμοπετάλια βρίσκονται συσσωρευμένα στον πυθμένα των σωλήνων. Αφού απορριφθεί η στιβάδα του PPP, συλλέγεται το PRP από όλους τους σωλήνες σε έναν και τα αιμοπετάλια αναδιαλύονται σε 600μl αντιδραστηρίου TG οπότε προκύπτει το stock διάλυμα αιμοπεταλίων.
- 12) Προκειμένου να εξακριβώσουμε την ποσότητα των αιμοπεταλίων που απομονώθηκαν καθώς και σε ποιο όγκο πρέπει να αραιωθούν, ώστε να γίνει η βιολογική δοκιμασία, γίνεται φωτομέτρηση στα 500nm ως εξής:

- Σε 10 λ από το stock διάλυμα προστίθενται 990 λ διαλύματος TG και σα τυφλό χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα TG. Ο συνολικός όγκος του διαλύματος των αιμοπεταλίων είναι 1000 λ.
- Γίνεται φωτομέρηση στα 500nm και προκύπτει απορρόφηση 0,133 Abs. Από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς προκύπτει ότι για να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση αιμοπεταλίων στο δείγμα προς εξέταση, που είναι $1.25 \cdot 10^9$ /ml, θα πρέπει η απορρόφηση του προς φωτομέτρηση δείγματος να είναι 0,1 Abs. Με μαθηματικούς υπολογισμούς προκύπτει ότι σε κάθε 750 λ από το αρχικό διάλυμα αιμοπεταλίων προστίθενται 250 λ TG, οπότε προκύπτει κατάλληλο διάλυμα αιμοπεταλίων για τη βιολογική δοκιμασία (working αιμοπεταλίων).

B. Προετοιμασία δειγμάτων

- Υπολογίστηκε το μέρος που πρέπει να ληφθεί από κάθε δείγμα προκειμένου να έχουν ληφθούν τελικά το πολύ 0,05 γρ. λίπους για τη βιολογική δοκιμασία. Κάθε δείγμα λίπους βρίσκεται διαλυμένο σε γνωστή ποσότητα CHCl_3 : CH_3OH : 1-1 (v/v) και η περιεκτικότητά του σε λίπος είναι επίσης γνωστή.
- Οι αντίστοιχες ποσότητες για τα δείγματα 2αTL, 3αTL, 4αTL, 2βTL, 3βTL και 4βTL λαμβάνονται σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες και οι διαλύτες εξατμίζονται με ρεύμα αζώτου οπότε μένει μόνο το λίπος.
- Το λίπος του 3βTL αναδιαλύεται σε 500 λ BSA (2,5 mg/l φυσιολογικού ορού) και προκύπτει αρκετά θολό διάλυμα έτοιμο για τη βιολογική δοκιμασία.
- Τα υπόλοιπα δείγματα που έχουν εξατμισθεί αραιώνονται κατά 10 φορές με διάλυμα CHCl_3 : CH_3OH : 1-1 (v/v) και παραλαμβάνεται το 1/10, οπότε έχουμε 0,005 γρ λίπους για αυτά. Εξατμίζονται πάλι με ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια αναδιαλύονται σε 500 λ BSA.
- Για τα υπόλοιπα δείγματα υπολογίζεται η ποσότητα που πρέπει να ληφθεί από το αρχικό δείγμα προκειμένου να ληφθούν 0,03 γρ λίπους. Στη συνέχεια αυτό αραιώνεται κατά 10 φορές και λαμβάνεται το 1/10 προς εξατμισμό αζώτου, οπότε τελικά λαμβάνονται 0,003 γρ λίπους για τη βιολογική δοκιμασία. Διαλύονται σε 500 λ BSA.

Γ. Βιολογικό πείραμα

I. ΟΡΓΑΝΑ

Η βιολογική δοκιμασία γίνεται με το συσσωρευματομέτρο (aggregometer) CHRONO-LOG που είναι ένα προσαρμοσμένο φωτόμετρο διπλής δέσμης με χώρο για δύο κυψελίδες, μία για το «τυφλό» διάλυμα χωρίς αιμοπετάλια και μία για το διάλυμα πλούσιο σε αιμοπετάλια όπου προστίθεται ο PAF και το δείγμα. Διαθέτει επίσης θερμόμετρο, θερμοστατούμενες βάσεις για την τοποθέτηση των δύο κυψελίδων, διακόπτη στροφών για την ρύθμιση της περιστροφής του μικρού μαγνήτη που τοποθετείται στις κυψελίδες και διακόπτη για τη ρύθμιση της κλίμακας διαπερατότητας του οργάνου. Συνοδευτικά υπάρχει το καταγραφικό CHRONO-LOG και ένα υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37° C, όπου παραμένουν οι κυψελίδες με το PRP για 15 λεπτά τουλάχιστον πριν τη δοκιμασία. Το καταγραφικό λειτουργεί στα 0,1 Volt και η ταχύτητα του χαρτιού είναι 2cm/min.

II. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΣΣΩΡΕΥΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ

Η αρχή της λειτουργίας του συσσωρευματομέτρου στηρίζεται στη μέτρηση και καταγραφή της διαπερατότητας του φωτός διαμέσου δείγματος πλούσιου σε αιμοπετάλια. Όταν τα αιμοπετάλια δεν έχουν συσσωρευτεί η διαπερατότητα είναι μικρή και ισούται με 0% της διαπερατότητας του οργάνου. Αντίθετα, όταν τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται υπό την επίδραση κάποιου συσσωρευτικού παράγοντα, όπως ο PAF, υπό την παρουσία δισθενών κατιόντων Ca^{+2} και ινωδογόνου στο περιβάλλον μέσο και μετά από προεπώαση στους 37° C και ανάδευση, η διαπερατότητα αυξάνει. Για τη ρύθμιση της διαπερατότητας 100% της κλίμακας του οργάνου χρησιμοποιείται σκέτο ρυθμιστικό διάλυμα TG χωρίς αιμοπετάλια. Σε κυψελίδες του οργάνου προστίθεται από ένα μικρό μαγνητάκι και μεταφέρονται σε κάθε μια από αυτές 50λ από το τελικό διάλυμα αιμοπεταλίων και 200λ από το διάλυμα TG-Ca^{+2} και παραμένουν στο υδατόλουτρο στους 37° C για 15 λεπτά τουλάχιστον. Στη συνέχεια σε νέα κυψελίδα προστίθενται 250λ ρυθμιστικού διαλύματος και χωρίς μαγνητάκι τοποθετείται στη θέση PPP του συσσωρευματομέτρου. Προς το τέλος της επώασης των αιμοπεταλίων τοποθετείται η γραφίδα στο καταγραφικό.

Μόλις τελειώσει ο χρόνος επώσης, μετακινούμε την κυψελίδα με το διάλυμα των αιμοπεταλίων από το υδατόλουτρο, τη σκουπίζουμε εξωτερικά ώστε να μην αλλοιωθούν οι μετρήσεις από τα μικρά σταγονίδια του νερού, ελέγχουμε ότι το μαγνητάκι βρίσκεται σε οριζόντια θέση και τοποθετούμε την κυψελίδα στη θέση PRP του οργάνου. Στη συνέχεια πατάμε το «Set Aggregation Baselines» για να οριστεί η κλίμακα διαπερατότητας του οργάνου, ώστε το διάλυμα των αιμοπεταλίων να αντιστοιχεί στο 0% της διαπερατότητας του οργάνου και το PPP στο 100% αυτής. Βλέπουμε την αντίστοιχη κίνηση της γραφίδας στο χαρτί, οπότε ορίζονται και τα όρια της κλίμακας.

III. ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ PAF

Προκειμένου να μελετηθεί η βιολογική δραστηριότητα των απομονωμένων λιποειδών από τα τρόφιμα, ελέγχουμε την αυτόνομη επίδρασή τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την επίδρασή τους στη συσσώρευση που προκαλεί ο PAF, φαινόμενα που θα συζητηθούν αναλυτικά παρακάτω. Για κάθε νέα σειρά κυψελίδων με αιμοπετάλια ελέγχεται η συγκέντρωση εκείνη του PAF που προκαλεί τη μέγιστη αντιστρεπτή μεταβολή ή πρακτικά που δίνει καμπύλη συσσώρευσης πλάτους 7-9 cm. Στην κυψελίδα με το διάλυμα των αιμοπεταλίων που βρίσκεται στη αντίστοιχη θέση PRP του συσσωρευματομέτρου προστίθεται με τη βοήθεια πιπέτας συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος PAF working συγκέντρωσης $2,5 \cdot 10^{-11}$ M (αυτή θα ήταν η συγκέντρωση του PAF στην κυψελίδα αν προσθέταμε 10λ από το διάλυμα) και ορισμένη ποσότητα διαλύματος δισθενών κατιόντων ασβεστίου που είναι απαραίτητα για να γίνει η συσσώρευση. Ανάλογα με την προκαλούμενη συσσώρευση προκαλούνται αλλαγές στη διαπερατότητα του φωτός του οργάνου, οι οποίες μεταφράζονται σχηματικά με την αντίστοιχη καμπύλη συσσώρευσης στο καταγραφικό.

Για κάθε συγκέντρωση αγωνιστή ή δείγματος που μελετάται απαιτείται νέα κυψελίδα με πλυμένα αιμοπετάλια. Μετά την προσθήκη της συγκεκριμένης ποσότητας PAF περιμένουμε να δούμε τη καμπύλη συσσώρευσης που προκαλείται και μπορεί να είναι:

1.Αντιστρεπτή: Σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μια αρχική αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων που ακολουθείται από συσσώρευση και επακόλουθη αύξηση της διαπερατότητας του φωτός μέχρι ένα σημείο. Στη συνέχεια η κατάσταση αυτή αντιστρέφεται, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων μειώνεται όπως και η

διαπερατότητα του φωτός, οπότε η καμπύλη επιστρέφει προς το αρχικό σημείο έναρξής της. Σε αυτή την περίπτωση μετράμε την απόσταση ανάμεσα στα δύο ακρινά σημεία.

2.Μη αντιστρεπτή: Καθώς αυξάνουμε την ποσότητα του PAF που προστίθεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων δεν αντιστρέφεται και η διαπερατότητα του φωτός συνεχώς αυξάνει με αποτέλεσμα η καμπύλη να μην επιστρέφει.

Έτσι, για παράδειγμα στην πρώτη σειρά αιμοπεταλίων προσθέσαμε 7 λ PAF συγκέντρωσης $2,5 \cdot 10^{-11}$ M, οπότε η τελική συγκέντρωση PAF στην κυψελίδα ήταν $1,75 \cdot 10^{-11}$ και προκλήθηκε αντιστρεπτή συσσώρευση με μέγιστο πλάτος καμπύλης 4 εκ. Στη συνέχεια προστέθηκαν 12λ συγκέντρωσης $2,5 \cdot 10^{-11}$ M, οπότε η τελική συγκέντρωση ήταν $3 \cdot 10^{-11}$ M και προκλήθηκε αντιστρεπτή μεταβολή με μέγιστο πλάτος 7,4 εκ. Στη συνέχεια προστέθηκαν 3λ συγκέντρωσης $2,5 \cdot 10^{-10}$ M, οπότε η τελική συγκέντρωση ήταν $7,5 \cdot 10^{-11}$ M και προκλήθηκε μη αντιστρεπτή συσσώρευση δίνοντας 100% συσσώρευση αιμοπεταλίων. Φαίνεται ότι τα 12 λ PAF $2,5 \cdot 10^{-11}$ M είναι κατάλληλη ποσότητα για τη βιολογική δοκιμασία αυτής της σειράς των αιμοπεταλίων. Αυτή η δοκιμή διαφόρων συγκεντρώσεων PAF γίνεται κάθε φορά που ξεκινάμε μετρήσεις με μια νέα σειρά κυψελίδων με αραιωμένο διάλυμα αιμοπεταλίων.

IV. ΤΕΛΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ

Σε κυψελίδα με διάλυμα αιμοπεταλίων που βρίσκεται στην αντίστοιχη θέση του συσσωρευματομέτρου προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα από το διάλυμα των απομονωμένων λιποειδών σε BSA και περιμένουμε για ένα λεπτό περίπου, ώστε να δούμε την επίδραση του δείγματος στα αιμοπετάλια. Στη συνέχεια προσθέτουμε την επιλεγμένη ποσότητα PAF και παρατηρούμε την επίδραση των λιποειδών στη δράση του PAF στα αιμοπετάλια, που είναι γνωστή για τη συγκεκριμένη ποσότητα. Αλλάζοντας κυψελίδα με αιμοπετάλια και ξαναρυθμίζοντας την πιπέτα σε νέα ποσότητα προσθέτουμε διαφορετική ποσότητα λιποειδών του ίδιου δείγματος ή διαφορετικού δείγματος επαναλαμβάνοντας την παραπάνω διαδικασία.

Σε κάθε νέα κυψελίδα με διάλυμα αιμοπεταλίων καλό είναι να ελέγχουμε με την πιπέτα αν το μαγνητάκι κουνιέται όπως πρέπει και κατά την προσθήκη είτε PAF, είτε ποσότητας λιποειδών, η άκρη της πιπέτας πρέπει να ακουμπάει στον πυθμένα της κυψελίδας.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

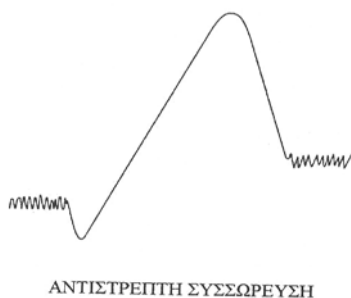
Ι. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

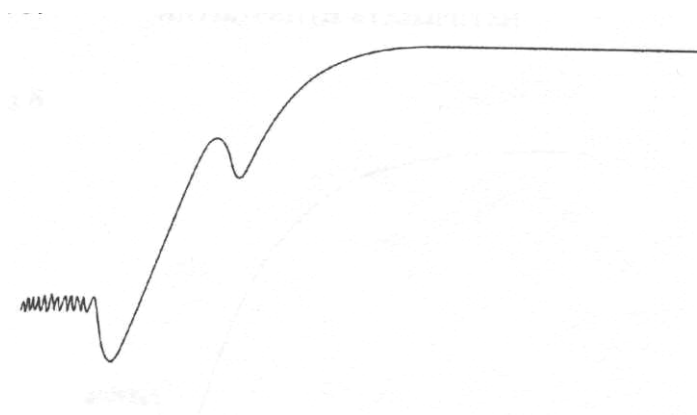
Πριν την καταγραφή των αποτελεσμάτων θεωρείται σκόπιμο να περιγραφεί ο τρόπος υπολογισμού του IC50 (Inhibitory Concentration 50) και του EC50 (Efficiency Concentration 50) καθώς και κάποια από τα φαινόμενα που παρατηρήθηκαν κατά την επίδραση των λιποειδών των τροφίμων στα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

α) Συσσώρευση (aggregation): Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων προκαλείται από διάφορους παράγοντες, που τα ενεργοποιούν, δρώντας μέσω κάποιων υποδοχέων και ονομάζονται **αγωνιστές**. Ένας καλά μελετημένος αγωνιστής είναι και ο PAF. Ένα δείγμα μπορεί να προκαλεί από μόνο του συσσώρευση των αιμοπεταλίων, δηλαδή δρα ως αγωνιστής, αλλά σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από τον PAF, πιθανά δρώντας μέσω των υποδοχέων του PAF στα αιμοπετάλια. Σε αυτή την περίπτωση ο PAF δεν μπορεί να δράσει. Στην περίπτωση που τα λιποειδή ενός τροφίμου προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω των υποδοχέων του PAF οι συσσωρευτικοί αυτοί παράγοντες αυξάνουν την αξία του γιατί ενδεχομένως ανταγωνίζονται τη δράση του PAF που είναι ο πλέον ισχυρός συσσωρευτικός παράγοντας στον οργανισμό. Στους πίνακες των αποτελεσμάτων η ένδειξη της συσσώρευσης συνοδεύεται και από το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης, που προκαλεί το δείγμα, καθώς και από το EC50 του αγωνιστή όταν αυτό μπορεί να υπολογισθεί. Στην περίπτωση που παρατηρείται διφασική συσσώρευση των αιμοπεταλίων αναγνωρίζονται δύο κύματα συσσώρευσης. Το πρώτο οφείλεται στην άμεση επίδραση του αγωνιστή σε υποδοχείς των αιμοπεταλίων και στη ενεργοποίησή τους, ενώ το δεύτερο προκαλείται από δευτερεύουσες ουσίες που εκλύονται από τα

αιμοπετάλια λόγω της δράσης του αγωνιστή και στη συνέχεια προκαλούν μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Οι καμπύλες της αντιστρεπτής και μη αντιστρεπτής συσσώρευσης φαίνονται στο σχήμα 2 και της διφασικής στο σχήμα 3.





Σχήμα 3: Καμπύλη διφασικής συσσώρευσης

Σχήμα 2: Καμπύλη αντιστρεπτής και μη συσσώρευσης

β)Ευόδωση: Τα λιποειδή ενός τροφίμου μπορεί να προκαλούν ευόδωση ή ενεργοποίηση της δράσης του PAF που φαίνεται από τη μετατροπή της καμπύλης συσσώρευσής του από αντιστρεπτή σε μη αντιστρεπτή ή σε αντιστρεπτή σημαντικά μεγαλύτερου ύψους. Το φαινόμενο αυτό μειώνει την διατροφική αξία των λιποειδών ενός τροφίμου γιατί ενισχύεται η δράση του PAF.

γ)Αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων: Το φαινόμενο αυτό συνήθως προηγείται το στάδιο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και υποδεικνύει την πιθανή ύπαρξη συσσωρευτικών παραγόντων σε μικρές ποσότητες. Η αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων καταγράφεται όπως φαίνεται στο σχήμα 4.



Σχήμα 1

δ)Απευαισθητοποίηση: Όταν ένα δείγμα προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων υπάρχει περίπτωση η προσθήκη PAF που ακολουθεί να μην προκαλεί συσσώρευση με το αναμενόμενο ύψος και την αναμενόμενη μορφή. Αυτό οφείλεται στο ότι τα

αιμοπετάλια έχουν απευαισθητοποιηθεί και δε διαθέτουν ελεύθερους υποδοχείς για τον PAF.

ε)Αναστολή: Τα λιποειδή ενός δείγματος μπορεί να προκαλέσουν αναστολή της δράσης του PAF ή κάποιου άλλου αγωνιστή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, μειώνοντας το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, που προκαλείται λόγω της επίδρασης του αγωνιστή. Σε αυτήν την περίπτωση στο δείγμα υπάρχουν **αναστολείς** και μπορούμε να υπολογίσουμε το IC50.

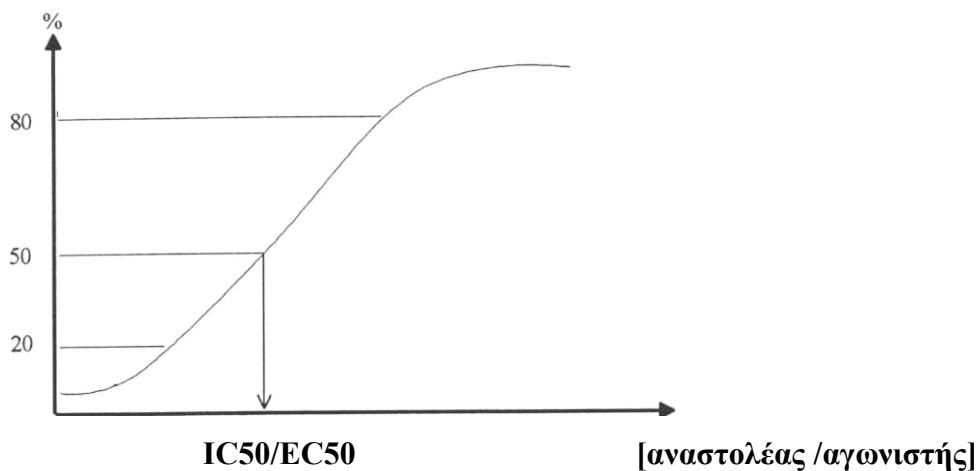
στ)IC50 (Inhibitory Concentration 50)

Ο δείκτης αυτός αντιστοιχεί στην ποσότητα εκείνη του λιποειδούς που προκαλεί αναστολή της δράσης του PAF ή κάποιου άλλου αγωνιστή ίση με το 50% της μέγιστης παρατηρούμενης συσσώρευσης από τη συγκεκριμένη ποσότητα του αγωνιστή. Όσο μικρότερο είναι το IC50 τόσο πιο δραστικό θεωρείται το τρόφιμο, αφού έχει την ικανότητα να προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του αγωνιστή σε μικρότερη ποσότητα. Για τον υπολογισμό του δείκτη αυτού ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

Με την προσθήκη του PAF ή κάποιου άλλου αγωνιστή στην κυψελίδα με τα αιμοπετάλια προκύπτει μια καμπύλη συσσώρευσης όποτε και μετριέται το ύψος της με τη βοήθεια χάρακα σε cm. Το μέγιστο ύψος συσσώρευσης είναι εκείνο που αντιστοιχεί στην πρώτη μη αντιστρεπτή συσσώρευση ή στην τελευταία- μέγιστη αντιστρεπτή και βρίσκεται με διαδοχικές δοκιμασίες διαφόρων συγκεντρώσεων του αγωνιστή (α cm). Αφού αυτό μετρηθεί με χάρακα προστίθεται στην κυψελίδα σε συγκεκριμένη συγκέντρωση ο παράγοντας που αναστέλλει τη συσσώρευση, προκύπτει μία καμπύλη αντιστρεπτής συσσώρευσης χαμηλότερου ύψους το οποίο και μετράται πάλι με χάρακα (β cm). Η επί της % αναστολή στο παράδειγμα αυτό είναι $[(\alpha - \beta) / \beta] \times 100$ και αποτελεί ένα σημείο της καμπύλης της συγκέντρωσης αναστολέα στην κυψελίδα και της %αναστολής που αυτός προκαλεί. Η καμπύλη αυτή έχει την μορφή που φαίνεται στην εικόνα 6 και είναι ευθεία στην περιοχή από 20% μέχρι και 80% αναστολή. Αν λοιπόν έχουμε 2 σημεία στην περιοχή αυτή και κατά προτίμηση εκατέρωθεν του 50%, μπορούμε εύκολα να χαράξουμε την ευθεία και να βρούμε την ποσότητα του αναστολέα στην κυψελίδα που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του αγωνιστή. Το IC50 είναι ένας από τους σημαντικότερους δείκτες αξιολόγησης και σύγκρισης των τροφίμων ως προς τη βιολογική δραστητικότητα των λιποειδών τους. Πιο σημαντικό είναι το IC50 των ολικών λιποειδών διότι με αυτή τη μορφή

λαμβάνονται τα λιποειδή από την τροφή, μετά των ουδέτερων και τελικά των πολικών.

Αναστολή /συσσώρευση



Σχήμα 2: Καμπύλη της % αναστολής /συσσώρευσης και της αντίστοιχης συγκέντρωσης του αναστολέα /αγωνιστή

ζ)EC50 (Efficiency Concentration 50)

Σε περίπτωση που σε ένα τρόφιμο δεν ανιχνεύονται αναστολείς παρά εμφανίζει μόνο συσσωρευτική δράση, δηλαδή συσσωρεύει τα αιμοπετάλια από μόνο του, δεν έχει νόημα ο υπολογισμός του IC50, ενώ υπολογίζεται το EC50 δηλαδή η συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα στην κυψελίδα που μπορεί να επάγει 50% συσσώρευση στα αιμοπετάλια και αποτελεί δείκτη της ισχύος του συγκεκριμένου αγωνιστή. Συγκεκριμένα ακολουθούνται οι παρακάτω ενέργειες:

Με την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων του αγωνιστή στη κυψελίδα παίρνουμε στο καταγραφικό καμπύλες συσσώρευσης διαφορετικού ύψους, και με τη βοήθεια χάρακα μετράμε το ύψος αυτό. Η 100% συσσώρευση των αιμοπεταλίων θεωρείται ότι αντιστοιχεί σε εκείνη τη συγκέντρωση του αγωνιστή που προκαλεί τη μέγιστη αντιστρεπτή ή την ελάχιστη μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων, το ύψος της οποίας μετριέται (α cm). Όλες οι άλλες συγκεντρώσεις του αγωνιστή που προκαλούν καμπύλες αντιστρεπτής συσσώρευσης χαμηλότερου ύψους θεωρείται ότι προκαλούν συσσώρευση χαμηλότερη του 100% οπότε και μετριέται με χάρακα το ύψος της κάθε καμπύλης (β cm). Το % ποσοστό συσσώρευσης που προκαλείται από τη συγκεκριμένη συγκέντρωση του αγωνιστή είναι $[\beta/\alpha] \times 100$ και αποτελεί ένα

σημείο της καμπύλης της %συσσώρευσης των αιμοπεταλίων συναρτήσει της συγκέντρωσης του αγωνιστή που έχει τη μορφή που φαίνεται στο σχήμα. Όπως φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση ευθεία γραμμή υπάρχει μεταξύ του 20% και 80% της μέγιστης συσσώρευσης, οπότε φθάνει να έχουμε δύο σημεία σε αυτό το διάστημα και κατά προτίμηση εκατέρωθεν του 50% ώστε να χαράξουμε την ευθεία και να βρούμε τη συγκέντρωση του αγωνιστή που αντιστοιχεί στο 50% της μέγιστης συσσώρευσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις του ίδιου αγωνιστή προκαλούν ελάχιστη μη αντιστρεπτή συσσώρευση του ίδιου ύψους προτιμάται η μικρότερη συγκέντρωση ενώ αν δίνουν παραπλήσιου ύψους η μικρότερη συγκέντρωση προτιμάται μόνο όταν η % διαφορά των δύο υψών δεν ξεπερνά το 5-10%. Όσο πιο μικρό είναι το EC50 ενός τροφίμου τόσο ισχυρότερους συσσωρευτικούς παράγοντες διαθέτει το τρόφιμο αυτό.

Στο συγκεκριμένο πείραμα τα IC50 και τα EC50 υπολογίζονται σαν ποσότητες λιποειδών από τα τρόφιμα γιατί η αραίωση που έχει γίνει πριν την προσθήκη στη κυψελίδα δεν είναι η ίδια για όλα τα δείγματα.

II. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Τα αποτελέσματα κάθε δείγματος φαίνονται παρακάτω αναλυτικά:

1. ΓΑΛΛΑ

ΓΑΛΛΑ ΠΛΗΡΕΣ

1αTL-Ολικά λιποειδή από πλήρες γάλα: Τα **50λ** προκάλεσαν ευόδωση της δράσης του PAF (4,5 cm/ 6,3 cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα) και ελαφρά αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων. Τα **75λ** προκαλούν αναστολή της δράσης του PAF κατά 27% (4,5-3,3/4,5x100) και τα **85λ** προκαλούν αναστολή της δράσης του PAF κατά 51% (4,5- 2,2/ 4,5 x 100). Από τα δύο αυτά σημεία υπολογίζεται το $IC_{50} \sim 85\lambda \Rightarrow 85\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = 5,1 \times 10^{-4}\gamma\rho$.

1αPL-Πολικά λιποειδή πλήρους γάλακτος: Τα **50λ** προκάλεσαν αναστολή του PAF κατά 60% (4,5-1,8 / 4,5 x 100). Τα **25λ** προκάλεσαν αναστολή του PAF κατά 18% (4,5-3,7/4,5x 100). Τα **75λ** προκάλεσαν μια μικρή αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων αλλά όχι συσσώρευσή τους. Από τα δύο αυτά σημεία υπολογίζεται το $IC_{50} \sim 43\lambda \Rightarrow 43\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = 2,58 \times 10^{-5}\gamma\rho$

1αNL- Ουδέτερα λιποειδή πλήρους γάλακτος: Τα **50λ** προκάλεσαν αναστολή του PAF κατά 24% (4,1- 3,1/ 4,1x 100). Τα **75λ** προκάλεσαν αναστολή του PAF κατά 56% (4,1- 1,8/4,1x 100). Το IC50 από τα δύο αυτά σημεία προκύπτει $\sim 71\lambda \Rightarrow$

$$71\lambda \times 0,003 \gamma\rho/500\lambda = \underline{4,26 \times 10^{-4} \gamma\rho}$$

ΓΑΛΛΑ LIGHT

1βTL- Ολικά λιποειδή από light γάλα: Τα **50λ** προκάλεσαν μια μικρή συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ύψος καμπύλης 0,6cm ενώ δεν επηρέασαν καθόλου τη δράση του PAF (4,5 cm/ 4,8cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Τα **75λ** προκάλεσαν αναστολή της δράσης του PAF κατά 69% (4,5-1,4/4,5x100). Τα **85λ** προκάλεσαν αναστολή της δράσης του PAF κατά 59% (4,1-1,7/4,1x100). Η μείωση της αναστολής με την αύξηση της ποσότητας ολικών λιποειδών που παρατηρείται δεν είναι σημαντική και πιθανότατα πρόκειται για πειραματικό σφάλμα. Το IC50 υπολογίζεται κατά προσέγγιση από την τιμή 85λ που προκαλούν αναστολή 59% και την τιμή 50λ που προκαλούν 0% αναστολή οπότε προκύπτει IC50~ 80λ=>
 $80\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = \underline{4,8 \times 10^{-4} \gamma\rho}$

1βPL-Πολικά λιποειδή από το light γάλα: Τα **50λ** προκαλούν αναστολή του PAF κατά 20% (4,5-3,6/4,5x100). Τα **75 λ** προκαλούν αναστολή του PAF κατά 40% (4,5-2,7/ 4,5x 100). Το IC50 υπολογίζεται από τα δύο αυτά σημεία κατά προσέγγιση οπότε προκύπτει ~ 88λ=> $88\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = \underline{5,28 \times 10^{-4} \gamma\rho}$

1βNL-Ουδέτερα λιποειδή από light γάλα: Τα **50λ** προκαλούν αναστολή του PAF κατά 22% (4,5-3,5/4,5x 100). Τα **75λ** προκαλούν αναστολή του PAF κατά 64% (4,5-1,6/4,5x100). Το IC50 υπολογίζεται από τα δύο αυτά σημεία οπότε προκύπτει ~ 66λ => $66\lambda \times 0,003\gamma\rho/ 500\lambda = \underline{3,96 \times 10^{-4} \gamma\rho}$

Πίνακας 1α: Αποτελέσματα βιολογικού πειράματος για το γάλα

	Συσώρευση αιμοπεταλίων από το δείγμα	Αλλαγή σχήματος	Καμία αλλαγή στον PAF	Αναστολή του PAF/ IC50	Ευόδωση του PAF
1αTL 50λ	–	+	–	–	+
75λ	–	–	–	–	(6,3/4,5cm)
85λ	–	–	–	–	–
				IC50=5,1x10 ⁻⁴ gr	
1αPL: 25λ	–	–	–	–	–
50λ	–	–	–	–	–
75λ	–	–	–	–	–
				IC50=2,58x10 ⁻⁴ gr	
1αNL:	–	–	–	–	–
50λ	–	–	–	–	–
75λ	–	–	–	–	–
				IC50=4,26x10 ⁻⁴ gr	
1βTL 50λ	–	–	–	–	–
75λ	–	–	–	–	–
85λ	–	–	–	–	–
				IC50=4,8x10 ⁻⁴ gr	
1βPL:50λ	–	–	–	–	–
75λ	–	–	–	–	–
				IC50= 5,28x10 ⁻⁴ gr	
1βNL:	–	–	–	–	–
50λ	–	–	–	–	–
75λ	–	–	–	–	–
				IC50=3,96x10 ⁻⁴ gr	

	TL	NL	PL
ΠΑΗΡΕΣ	$5,1 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$4,26 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$2,58 \times 10^{-4} \gamma\rho$
LIGHT	$4,8 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$3,96 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$5,28 \times 10^{-4} \gamma\rho$

Πίνακας 1β :IC50 για πλήρες και light γάλα

Αποτελέσματα και συμπεράσματα για το γάλα: Τα αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για το γάλα φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 1α και στον πίνακα 1β. Στο γάλα φαίνεται να επικρατούν αναστολείς του PAF, τόσο στα πολικά όσο και στα ουδέτερα λιποειδή, με εξαίρεση τα ολικά λιποειδή του light γάλατος όπου ανιχνεύεται και η ύπαρξη αγωνιστών. Η ύπαρξη κυρίως αναστολέων του PAF στο γάλα συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας σχετικά με τη βιολογική δραστηριότητα των λιποειδών του γάλακτος (47).

Από τη σύγκριση της δραστηριότητας των **ολικών λιποειδών** του πλήρους και light τροφίμου φαίνεται να υπάρχει διαφορά ως προς την ανίχνευση αγωνιστών, που προκαλούν συσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα 50λ του light τροφίμου προκαλούν μικρή συσώρευση, ενώ τα 50 λ του πλήρους προκαλούν αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων. Επομένως στο light τρόφιμο ανιχνεύεται η ύπαρξη αγωνιστών, σε αντίθεση με το πλήρες τρόφιμο, όπου δεν φαίνεται τέτοια δράση. Επίσης, τα 75λ του πλήρους τροφίμου προκαλούν 21% αναστολή του PAF, ενώ τα 75λ του light προκαλούν 65% αναστολή του PAF, αλλά κατά πάσα πιθανότητα πρόκειται για κάποιο λάθος στη δεύτερη περίπτωση, αφού τα 85λ προκαλούν παρόμοια αναστολή και στα δύο τρόφιμα κοντά στο 50%, και επομένως το IC50 τους είναι περίπου το ίδιο (πίνακας 1β).

Από τη σύγκριση των **πολικών λιποειδών** των δύο προϊόντων δε φαίνεται κάποια σημαντική διαφορά, αφού τα IC50 βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους και δεν παρατηρείται συσώρευση των αιμοπεταλίων από κανένα δείγμα παρά μόνο μια αλλαγή σχήματός από τα 75λ των πολικών λιποειδών, που όμως δεν αρκεί για να εντοπισθεί διαφορά.

Από τη σύγκριση των **ουδέτερων λιποειδών** δεν προκύπτει καμία διαφορά στη βιολογική δραστηριότητα των λιποειδών των δύο προϊόντων, αφού τα IC50 είναι παρόμοια και δεν εμφανίζεται οποιαδήποτε επίδραση των λιποειδών στα αιμοπετάλια.

Από τη συνολική ανασκόπηση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι για το γάλα όπου κυριαρχούν λιποειδή με ανασταλτική δράση έναντι του PAF, η μοναδική διαφορά

ανάμεσα στο πλήρες και στο light τρόφιμο εντοπίζεται στα ολικά λιποειδή όπου φαίνεται πιο έντονη η ύπαρξη αγωνιστών στο light τρόφιμο, πιθανά λόγω αφαίρεσης αναστολέων κατά την επεξεργασία.

2.ΓΙΑΟΥΡΤΙ

ΓΙΑΟΥΡΤΙ ΠΛΗΡΕΣ

2αTL - Ολικά λιποειδή από γιαούρτι πλήρους σε λιπαρά: Αρχικά προστέθηκαν **20** λ διαλύματος που προκάλεσαν ελαφριά αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και στη συνέχεια μετά την προσθήκη του PAF παρατηρήθηκε μεταβολή της καμπύλης συσσώρευσης του από αντιστρεπτή σε μη αντιστρεπτή μεγαλύτερου ύψους, δηλαδή ευοδόθηκε η συσσωρευτική δράση του. Στη συνέχεια προστέθηκαν **50** λ διαλύματος λιποειδών, οπότε φάνηκε και πάλι η αλλαγή στο σχήμα των αιμοπεταλίων, αλλά αυτή τη φορά η δράση του PAF αναστάλθηκε κατά 44% ($8,5-4,8 / 8,5 \times 100$). Ταυτόχρονα προκύπτει και το $IC_{50} \sim 56 \lambda \Rightarrow 56 \lambda \times 0,005 \gamma\rho / 500 \lambda = 5,6 \times 10^{-4} \gamma\rho$, αφού η αναστολή κατά 44% είναι πολύ κοντά στο 50%. Τέλος προστίθενται **5** λ οπότε δεν εμφανίζεται ούτε αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, ούτε αλλαγή της συσσώρευσης που προκαλεί ο PAF.

2αPL- Πολικά λιποειδή από γιαούρτι πλήρες σε λιπαρά: Με προσθήκη **50**λ διαλύματος δεν προκαλείται συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ούτε αλλαγή του σχήματος τους, ενώ μετά την προσθήκη PAF, η συσσωρευτική του δράση αναστέλλεται κατά 93% ($6,8- 0,5 / 5,8 \times 100$). Η προσθήκη **20** λ είχε τα ίδια αποτελέσματα, μόνο που αυτή τη φορά η αναστολή της δράσης του PAF ήταν ίση με 68% ($6,8 - 2,2 / 6,8 \times 100$). Τέλος η προσθήκη **8** λ προκάλεσε αναστολή του PAF κατά 49% ($6,8- 3,5 / 6,8 \times 100$). Από τις τρεις αυτές τιμές 49, 68 και 93 % αναστολής της δράσης του PAF προκύπτει ότι το

$$IC_{50}=9,5\lambda \Rightarrow 9,5\lambda \times 0,003 \gamma\rho / 500\lambda = 5,7 \times 10^{-5} \gamma\rho.$$

2αNL- Ουδέτερα λιποειδή από γιαούρτι πλήρες σε λιπαρά: Στην αρχή προσθέτουμε **50** λ οπότε παρατηρούμε αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή της δράσης του PAF κατά 72% ($6,8 - 1,9 / 6,8 \times 100$). Στη συνέχεια προστίθενται **8** λ οπότε εμφανίζεται ελαφριά συσσώρευση των αιμοπεταλίων με καμπύλη συσσώρευσης ύψους 0,6 εκ., και αναστολή της δράσης του PAF κατά 13% ($6,8-5,9 / 6,8 \times 100$). Στη συνέχεια για να εξακριβωθεί η συσσωρευτική επίδραση του δείγματος προστέθηκαν **15**λ οπότε εμφανίστηκε αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων αλλά όχι ιδιαίτερα έντονη και με προσθήκη **5**λ δεν υπήρξε καμία εμφανής διαφορά.

Το IC₅₀ = 34λ => $34\lambda \times 0,003 \text{ γρ} / 500\lambda = \underline{2,04 \times 10^{-4} \text{ γρ}}$, από τις τιμές 72 και 13 % αναστολής.

ΓΙΑΟΥΡΤΙ LIGHT

2βTL- Ολικά λιποειδή γιαουρτιού χαμηλού σε λιπαρά: Με προσθήκη 5λ δεν παρατηρείται αλλαγή απευθείας στα αιμοπετάλια αλλά αναστολή της δράσης PAF κατά 29% (8,5-6/8,5x100). Με προσθήκη 20λ παρατηρούμε αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή του PAF κατά 24% (8,5-6,5/8,5x100). Τέλος με προσθήκη 50λ εμφανίζεται συσσώρευση των αιμοπεταλίων με καμπύλη συσσώρευσης ύψους 0,6 εκ. και αναστολή της δράσης του PAF κατά 55% (8,5-3,8/8,5x100). Από τις παραπάνω τιμές 24 και 55% αναστολής προκύπτει η IC₅₀= 46λ => $46\lambda \times 0,005 \text{ γρ} / 500\lambda = \underline{4,6 \times 10^{-4} \text{ γρ}}$.

2βPL- πολικά λιποειδή από γιαούρτι χαμηλό σε λιπαρά: Με προσθήκη 50 λ δεν προκαλείται συσσώρευση ή αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων αλλά εμφανίζεται 100% αναστολή της δράσης του PAF. Στη συνέχεια προστίθενται 30 λ που εμφανίζουν ακριβώς την ίδια συμπεριφορά με τα 50 λ. Με προσθήκη 9 λ χωρίς να παρατηρείται αλλαγή του σχήματος ή συσσώρευση των αιμοπεταλίων προκαλείται αναστολή της δράσης του PAF κατά 59% (6,8-2,8/6,8x100). Τέλος ούτε τα 70 λ προκαλούν αλλαγή στο σχήμα ή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το IC₅₀ με τη βοήθεια των παραπάνω τιμών αναστολής βρίσκεται πολύ κοντά στα 9λ => $9\lambda \times 0,003 \text{ γρ} / 500\lambda = \underline{5,4 \times 10^{-5} \text{ γρ}}$.

2βNL- Ουδέτερα λιποειδή από γιαούρτι χαμηλό σε λιπαρά: Με προσθήκη 50 λ εμφανίζεται αλλαγή σχήματος και αναστολή της δράσης του PAF κατά 68% (6,8-2,2/6,8x100). Με προσθήκη 70 λ εμφανίζεται πολύ μικρή αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή του PAF κατά 94% (6,8-0,4/6,8x100). Τέλος με προσθήκη 25λ δεν εμφανίζεται αλλαγή σχήματος ή συσσώρευση αλλά η δράση του PAF αναστέλλεται κατά 62% (6,8-2,6/6,8x100). Για την χάραξη της καμπύλης και την εύρεση του IC₅₀ χρησιμοποιούνται οι τιμές αναστολής 68 και 94% οπότε IC₅₀~ 37λ=> $37\lambda \times 0,003 / 500 \text{ γρ} = \underline{2,22 \times 10^{-4} \text{ γρ}}$

Πίνακας 2α: Αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για το γιαούρτι

	Συσώρευση αιμοπεταλίων από το δείγμα	Αλλαγή σχήματος	Καμία αλλαγή στον PAF	Αναστολή του PAF/ IC50	Ευόδωση του PAF
2αTL(0,005γρ): 5λ	—	—	+	—	—
20λ	—	+	—	—	+
50λ	—	+	—	+(44%)	—
				IC50=5,6x10 ⁻⁴ γρ	
2αPL: 8λ	—	+	—	+(49%)	—
20λ	—	—	—	+(68%)	—
50λ	—	—	—	+(93%)	—
				IC50=5,7x10 ⁻⁵ γρ	
2αNL: 5λ	—	—			
8λ	+(0,6εκ)	—	—	+(13%)	—
15λ	—	+			
50λ	—	+	—	+(72%)	—
				IC50=2,04x10 ⁻⁴ γρ	
2βTL(0,005γρ): 5λ	—	—	—	+(29%)	—
20λ	—	+	—	+(24%)	—
50λ	+(0,6 εκ)	+	—	+(55%)	—
				IC50= 4,6x10 ⁻⁴ γρ	
2βPL:9λ	—	—	—	+(59%)	—
30λ	—	—	—	+(100%)	—
50λ	—	—	—	+(100%)	—
70λ	—	—			
				IC50= 5,4x10 ⁻⁵ γρ	
2βNL: 25λ	—	—	—	+(62%)	—
50λ	—	+	—	+(68%)	—
70λ	—	+	—	+(94%)	—
				IC50=2,22x10 ⁻⁴ γρ	

Πίνακας 2β: IC50 για πλήρες και light γιαούρτι

	TL	NL	PL
ΠΛΗΡΕΣ	$5,6 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$2,04 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$5,7 \times 10^{-5} \gamma\rho$
LIGHT	$4,6 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$2,22 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$5,4 \times 10^{-5} \gamma\rho$

Αποτελέσματα και συμπεράσματα για το γιαούρτι

Τα αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για το γιαούρτι φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 2α και στον πίνακα 2β. Στο γιαούρτι φαίνεται η παρουσία αναστολέων της δράσης του PAF, στα πολικά και ουδέτερα λιποειδή, με πιθανά ισχυρότερους αυτών των πολικών λιποειδών, όπως φαίνεται από τα χαμηλότερα IC50 που εμφανίζουν. Η ανίχνευση αναστολέων και η απουσία συσσωρευτών συμφωνεί με τα αποτελέσματα έρευνας που μελέτησε αναλυτικότερα τις βιολογικές δράσεις των κλασμάτων των λιποειδών του γιαουρτιού (47).

Η σύγκριση των επιμέρους αποτελεσμάτων για τα ολικά λιποειδή, τα ουδέτερα και τα πολικά του πλήρους και αποβουτυρωμένου γιαουρτιού δεν εμφανίζει έντονες διαφορές ανάμεσα στο πλήρες και στο light τρόφιμο ως προς τη δραστηριότητα των λιποειδών τους. Έτσι, τα **ολικά λιποειδή** εμφανίζουν σχεδόν την ίδια επίδραση στα αιμοπετάλια, με μόνη διαφορά ότι τα 20 λ του πλήρους τροφίμου προκαλούν ευόδωση του PAF, ενώ στο light τρόφιμο η ίδια ποσότητα ολικών λιποειδών προκαλεί αναστολή της δράσης του PAF. Τα IC50 είναι επίσης πολύ κοντά (Πίνακας 2β).

Στα **πολικά λιποειδή**, δε φαίνεται καμία σημαντική διαφορά ως προς τη δραστηριότητα τους. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τα **ουδέτερα λιποειδή**. Φαίνεται ότι η μείωση του περιεχόμενου λίπους και η επεξεργασία που υφίσταται το light γιαούρτι δεν αλλάζει τη βιολογική δραστηριότητα των λιποειδών του ως προς την επίδρασή τους στα αιμοπετάλια και στη δράση του PAF.

3. ΜΑΡΓΑΡΙΝΗ

ΜΑΡΓΑΡΙΝΗ ΠΛΗΡΗΣ

3αTL- Ολικά λιποειδή από μαργαρίνη (0,005γρ σε 500λ BSA): Όταν προσθέτουμε 4λ δεν εμφανίζεται αλλαγή σχήματος ή συσώρευση των αιμοπεταλίων και η δράση του PAF δεν αλλάζει. Δοκιμάζουμε τη μεγαλύτερη ποσότητα των **20λ** και ενώ πάλι

δεν εμφανίζεται αλλαγή σχήματος ή συσσωρευση των αιμοπεταλίων, η δράση του PAF αναστέλλεται κατά 73% (8,5-2,3/8,5x100). Με μεγαλύτερη ποσότητα των **30λ** παρατηρείται συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ύψος καμπύλης συσσωρευσης 0,7εκ., ενώ η δράση του PAF ευοδώνεται αφού αυξάνει σημαντικά το ύψος της καμπύλης συσσωρευσης (8,5εκ/11,5εκ: πριν και μετά). Με **60λ** προκαλείται συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ύψος καμπύλης συσσωρευσης 0,5 εκ. ενώ η καμπύλη συσσωρευσης του PAF μετατρέπεται σε μη αντιστρεπτή αλλά με μικρότερο ύψος για τον ίδιο χρόνο. Το φαινόμενο αυτό είναι πιθανό να σημαίνει αποδιάταξη των λιποειδών της μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Το IC50 προκύπτει από καμπύλη με σημεία 0% και 73% αναστολής οπότε το IC50 είναι περίπου $13\lambda \Rightarrow 13 \times 0,005/500 \gamma\rho = 1,3 \times 10^{-4} \gamma\rho$.

3αPL- Πολικά λιποειδή από μαργαρίνη: Με **50λ** παρατηρήθηκε αλλαγή σχήματος αιμοπεταλίων και αναστολή της συσσωρευσης της δράσης του PAF κατά 100%. Η επίδραση των **70λ** είναι ακριβώς η ίδια. Τα **35λ** δεν προκαλούν συσσωρευση ή αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, ενώ εμφανίζουν αναστολή της δράσης του PAF κατά 94% (6,8-0,4/6,8x100). Αν και δεν μπορεί να υπολογισθεί το IC50 με ακρίβεια, λαμβάνοντας υπ' όψη την 94% αναστολή στα 35λ, το IC50 θα βρίσκεται κοντά στα $15\lambda \Rightarrow 15 \times 0,003/500 \gamma\rho = 9 \times 10^{-5} \gamma\rho$.

3αNL- Ουδέτερα λιποειδή από μαργαρίνη: Με **50λ** παρατηρούμε συσσώρευση των αιμοπεταλίων με καμπύλη συσσωρευσης ύψους 0,7 εκ. και αναστολή της δράσης του PAF κατά 35% (6,8-4,4/6,8x100). Με **70λ** παρατηρείται αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή της δράσης του PAF κατά 82% (6,8-1,2/6,8x100). Με **35λ** εμφανίζεται αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή της δράσης του PAF κατά 31% (6,8-4,7/6,8x100). Για την καμπύλη και την εύρεση του IC50 χρησιμοποιούνται οι τιμές 31 και 82% αναστολής και προκύπτει $IC_{50} \sim 48\lambda \Rightarrow 48 \times 0,003/500 \gamma\rho = 2,88 \times 10^{-4} \gamma\rho$.

MARGARINH LIGHT

3βTL-Ολικά λιποειδή από μαργαρίνη light (0,05γρ σε 500λ BSA) : Με προσθήκη **2λ** δεν εμφανίζεται αλλαγή του σχήματος ή συσσωρευση των αιμοπεταλίων, ενώ η δράση του PAF ευοδώνεται, αφού η καμπύλη συσσωρευσης μετατρέπεται από αντιστρεπτή σε μη αντιστρεπτή. Με **6 λ** τα φαινόμενα που παρατηρούνται είναι ακριβώς τα ίδια με την καμπύλη του PAF να παραμένει αντιστρεπτή, αλλά με μεγαλύτερο ύψος (7/11cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα).

Επιλέχθηκαν μικρές ποσότητες διαλύματος λιποειδών γιατί το δείγμα αυτό περιέχει 0,05γρ λίπους σε 500λ BSA.

3βPL-πολικά λιποειδή από μαργαρίνη light: Με προσθήκη **50λ** παρατηρείται έντονη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, χωρίς την προσθήκη PAF, με καμπύλη συσσώρευσης ύψους 1,2εκ. και αναστολή της δράσης του PAF κατά 100%. Με **20λ** παρατηρείται αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή της δράσης του PAF κατά 94% ($8,5-0,5/8,5 \times 100$). Με **4λ** δεν παρατηρείται αλλαγή του σχήματος ή συσσώρευση των αιμοπεταλίων και η δράση του PAF αναστέλλεται κατά 24% ($8,5-6,5/8,5 \times 100$). Προσπαθώντας να διερευνήσουμε την εμφανή συσσωρευτική δράση των πολικών λιποειδών της light μαργαρίνης δοκιμάζουμε ποσότητα **35λ** οπότε εμφανίζεται συσσώρευση με καμπύλη ύψους 0,9εκ. και **70λ** οπότε προκαλείται συσσώρευση με καμπύλη ύψους 5,2εκ. Για την εύρεση του IC50 χρησιμοποιούνται οι τιμές 25 και 96% αναστολής, οπότε προκύπτει $IC_{50} \sim 10\lambda \Rightarrow 10 \times 0,003/500 \gamma\rho = 6 \times 10^{-5} \gamma\rho$.

3βNL- Ουδέτερα λιποειδή από light μαργαρίνη: Με προσθήκη **20λ** δεν εμφανίζεται αλλαγή σχήματος ή συσσώρευση των αιμοπεταλίων και παρατηρείται ευόδωση της δράσης του PAF αφού η καμπύλη συσσώρευσης μετατρέπεται από αντιστρεπτή σε μη αντιστρεπτή. Με **50 λ** παρατηρείται πολύ έντονη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με καμπύλη συσσώρευσης ύψους 12εκ.

	TL	NL	PL
ΠΑΛΗΡΕΣ	$1,3 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$2,88 \times 10^{-4} \gamma\rho$	$9 \times 10^{-5} \gamma\rho$
LIGHT	-	-	$6 \times 10^{-5} \gamma\rho$

Πίνακας 3β: IC50 για το πλήρες και light μαργαρίνη

Πίνακας 3α: Αποτελέσματα βιολογικού πειράματος για τη μαργαρίνη

	Συσώρευση αιμοπεταλίων από το δείγμα	Αλλαγή σχήματος	Καμία αλλαγή στον PAF	Αναστολή του PAF/IC50	Ευόδωση του PAF
3αTL(0,005γρ) : 4λ	–	–	+	–	–
20λ	–	–	–	+(73%)	–
30λ	+(0,7εκ.)	–	–	–	+(8,5/11,5cm)
60λ	+(0,5εκ.)	–	–	–	+
				IC50=1,3x10 ⁻⁴ γρ	
3αPL:35λ	–	–	–	+(94%)	–
50λ	–	+	–	+(100%)	–
70λ	–	+	–	+(100%)	–
				IC50= 9x10 ⁻⁵ γρ	
3αNL:35λ	–	+	–	+(31%)	–
50λ	+(0,7εκ)	–	–	+(35%)	–
70λ	–	+	–	+(82%)	–
				IC50=2,88x10 ⁻⁴ γρ	
3βTL(0,05γρ): 2λ	–	–	–	–	+
6λ	–	–	–	–	+(7/11cm)
3βPL: 4λ	–	–	–	+(24%)	–
20λ	–	+	–	+(94%)	–
35λ	+(0,9εκ)				
50λ	+(1,2εκ)	–	–	+(100%)	–
70λ	+(5,2εκ)	–	–		
				IC50= 6x10 ⁻⁵ γρ	
3βNL: 20λ	–	–	–	–	+
50λ	+(12εκ)	–			

Αποτελέσματα και συμπεράσματα για τη μαργαρίνη: Τα αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για τη μαργαρίνη φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 3α και στον πίνακα 3β. Η μαργαρίνη φαίνεται ότι διαθέτει ουσίες που προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλλά και αναστολές του PAF. Επίσης παρατηρείται ευόδωση της δράσης του PAF κυρίως από τα ολικά λιποειδή της light μαργαρίνης που φαίνεται ότι οφείλεται σε συσσωρευτικούς παράγοντες των ουδέτερων λιποειδών της, που πιθανά να μη δρουν μέσω κοινών υποδοχέων με τον PAF ή δρουν προετοιμάζοντας τα αιμοπετάλια για τη δράση του. Το ίδιο φαινόμενο ανιχνεύεται και στα ολικά λιποειδή της πλήρους μαργαρίνης, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Από τη σύγκριση της συμπεριφοράς των **ολικών λιποειδών** της πλήρους και light μαργαρίνης δεν προκύπτει κάποιο ξεκάθαρο συμπέρασμα. Η ίδια ποσότητα ολικών λιποειδών στην πλήρη μαργαρίνη προκαλεί μικρού ύψους συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ενώ στη χαμηλού λίπους δε φαίνεται τέτοια επίδραση στα αιμοπετάλια. Είναι πιθανό με τις δύο μόνο συγκεντρώσεις λιποειδών που δοκιμάστηκαν για την light μαργαρίνη να μην ανιχνεύθηκε η συσσωρευτική τους επίδραση στα αιμοπετάλια, η οποία φαίνεται αρκετά καθαρά στις παρακάτω δοκιμές των ουδέτερων και πολικών λιποειδών. Και τα δύο δείγματα ολικών λιποειδών πλήρους και light φαίνεται ότι προκαλούν ευόδωση της δράσης του PAF, με εξαίρεση τα 20λ της πλήρους μαργαρίνης που προκαλούν αναστολή. Σε αντίθεση, η ίδια ποσότητα ολικών λιποειδών της light προκαλεί ευόδωση της δράσης του PAF. Φαίνεται ότι τα λιποειδή της μαργαρίνης λειτουργούν κυρίως σαν αγωνιστές του PAF και συσσωρευτές των αιμοπεταλίων, αλλά φαίνεται επίσης ότι η πλήρης μαργαρίνη διαθέτει και κάποια ανιχνεύσιμη ποσότητα αναστολέων ή αγωνιστών που αναστέλλουν τη δράση του PAF σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτόν, ώστε να παρουσιάζεται και αναστολή της δράσης του, που δε φαίνεται να έχουν τα ολικά λιποειδή της light μαργαρίνης.

Τα **πολικά λιποειδή** των δύο προϊόντων δεν παρουσιάζουν έντονες διαφορές ως προς την επίδραση στη δράση του PAF, αφού και στις δύο περιπτώσεις αναστέλλουν τη δράση του. Τα πολικά της light μαργαρίνης εμφανίζουν πολύ πιο έντονη συσσωρευτική δράση στα αιμοπετάλια, ενώ οι ίδιες ποσότητες πολικών λιποειδών της πλήρους μαργαρίνης προκαλούν μόνο αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και όχι καθαρή συσσώρευσή τους. Είναι πιθανό αυτή η διαφορά να οφείλεται στην

ύπαρξη κάποιων αναστολέων στα πολικά λιποειδή της πλήρους μαργαρίνης που δεν επιτρέπουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, και λείπουν από τη light μαργαρίνη, οπότε και εμφανίζεται συσσωρευτική δράση. Είναι επίσης πιθανό να υπάρχουν πιο έντονοι συσσωρευτικοί παράγοντες- αγωνιστές στα πολικά λιποειδή της light μαργαρίνης ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας. Τα IC50 των πολικών λιποειδών της πλήρους και light μαργαρίνης δε διαφέρουν πολύ μεταξύ τους και πιθανά η διαφορά να οφείλεται σε επιπλέον συσσωρευτές της light μαργαρίνης.

Στα **ουδέτερα λιποειδή** των δύο προϊόντων φαίνεται πιο έντονη η διαφορά ως προς τη δραστηριότητα. Και στις δύο περιπτώσεις η τάση για συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι εμφανής, αλλά στο πλήρες τρόφιμο είναι πολύ λιγότερο έντονη από ότι στο light και ενώ τα ουδέτερα λιποειδή του πλήρους τροφίμου αναστέλλουν τη δράση του PAF, τα αντίστοιχα λιποειδή του light ευοδώνουν τη δράση του ή προκαλούν έντονη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, χωρίς να επηρεάζουν τη δράση του PAF. Είναι πιθανό η διαφορά αυτή να οφείλεται στην ύπαρξη κάποιων αναστολέων στα ουδέτερα λιποειδή του πλήρους τροφίμου που εμποδίζουν την εμφάνιση της συσσωρευτικής δράσης και που έχουν μειωθεί σημαντικά στο light τρόφιμο, λόγω της επεξεργασίας που έχει υποστεί. Επίσης είναι πιθανή η ύπαρξη ισχυρών συναγωνιστών του PAF στο light τρόφιμο που δεν υπάρχουν στο πλήρες, ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας.

Η διαφορά στη βιολογική δραστηριότητα των λιποειδών της πλήρους και light μαργαρίνης είναι τέτοια ώστε να έχει νόημα η περαιτέρω διερεύνηση της βιολογικής δράσης των κλασμάτων των λιποειδών τους ώστε να εξακριβωθεί ποια λιποειδή είναι υπεύθυνα για αυτή τη διαφορά.

4. ΚΑΣΕΡΙ

ΚΑΣΕΡΙ ΠΛΗΡΕΣ

4αTL- Ολικά λιποειδή από κασέρι: Με **50λ** παρατηρείται αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή της δράσης του PAF κατά 60% (8,5-3,4/8,5x100). Με **20λ** παρατηρούμε συσσώρευση των αιμοπεταλίων με καμπύλη συσσώρευσης πλάτους 0,6εκ. και η δράση του PAF ευοδώνεται αφού η καμπύλη συσσώρευσης παραμένει αντιστρεπτή αλλά αυξάνεται κατά πολύ σε ύψος (8,5/11,5cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Τέλος με **5λ** παρατηρείται αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και ευόδωση της δράσης του PAF (8,5/10,5: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα), όπως

ακριβώς και με τα 20λ. Το IC₅₀ στην περίπτωση αυτή υπολογίζεται κατά εκτίμηση από τις τιμές 0% αναστολή στα 0λ και 50% στα 50λ χωρίς να είναι απόλυτα σωστό αφού τα δύο αυτά σημεία δε βρίσκονται στην ίδια ευθεία. Οπότε IC₅₀~ 42λ => $42\lambda \times 0,005\gamma\rho / 500\lambda = 4,2 \times 10^{-5}\gamma\rho$.

4αPL- Πολικά λιποειδή από πλήρες κασέρι: Με 50λ παρατηρούμε πολύ ελαφριά αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή της δράσης του PAF κατά 57,7% (4,5-1,9/4,5x100). Με 25λ δεν εμφανίζεται καμία αλλαγή στα αιμοπετάλια ή στη δράση του PAF (4,5cm / 4,7 cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Τέλος με προσθήκη 75λ παρατηρούμε μόνο μία ελαφριά αλλαγή σχήματος. Το IC₅₀ και σε αυτή την περίπτωση υπολογίζεται όπως και πριν οπότε προκύπτει IC₅₀~ 43λ => $43\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = 2,6 \times 10^{-4}\gamma\rho$.

4αNL- Ουδέτερα λιποειδή από πλήρες κασέρι: Με 50λ παρατηρούμε αναστολή της δράσης του PAF κατά 13% (4,5-3,9/4,5x100). Με 75λ προκαλείται αναστολή της δράσης του PAF κατά 40% (4,5-2,7/4,5x100). Το IC₅₀ σε αυτή την περίπτωση είναι 85λ => $85\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = 5,1 \times 10^{-4}\gamma\rho$.

ΚΑΣΕΡΙ LIGHT

4βTL-Ολικά λιποειδή από κασέρι χαμηλό σε λιπαρά: Με προσθήκη 5λ παρατηρείται αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και ευόδωση της δράσης του PAF αφού από αντιστρεπτή η καμπύλη συσώρευσης μετατρέπεται σε μη αντιστρεπτή. Την ίδια ακριβώς εικόνα βιολογικής δραστηριότητας εμφανίζουν και τα 20λ. Τέλος τα 50 λ ενώ εμφανίζουν αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, αναστέλλουν τη δράση του PAF κατά 60% (8,5-3,4/8,5x100). Το IC₅₀ υπολογίζεται κατά προσέγγιση από τα τιμές 0% αναστολή από 0λ και 60% αναστολή από 50λ, οπότε προκύπτει 42λ=> $42\lambda \times 0,005\gamma\rho / 500\lambda = 4,2 \times 10^{-4}\gamma\rho$.

4βPL- Πολικά λιποειδή από κασέρι χαμηλό σε λιπαρά: Με προσθήκη 50 λ στην κυψελίδα δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στα αιμοπετάλια και στη δράση του PAF (4,5 / 4,8: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Με προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας λιποειδών 80λ εμφανίζεται αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή της δράσης του PAF κατά 49% (4,5-2,3/4,5x100). Με προσθήκη 100λ αλλά σε νέα αιμοπετάλια δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή σε αυτά. Το IC₅₀ είναι πολύ κοντά στα 80λ που μας δίνουν 49% αναστολή οπότε είναι $80\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = 4,8 \times 10^{-4}\gamma\rho$

4βNL- Ουδέτερα λιποειδή από κασέρι χαμηλό σε λιπαρά: Με προσθήκη **50λ** δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στα αιμοπετάλια ή στη δράση του PAF (4,5/ 4,5: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Με προσθήκη **75λ** παρατηρούμε αναστολή της δράσης του PAF κατά 64% (4,5-1,6 / 4,5 x100). Το IC50 σε αυτή την περίπτωση υπολογίζεται πάλι κατά προσέγγιση από τις τιμές 0% αναστολή από τα 50λ και 64% αναστολή από τα 75λ οπότε προκύπτει IC50 ~ 69λ =>
 $69λ \times 0,003γρ / 500λ = 4,14 \times 10^{-4}γρ$

Πίνακας 4β: IC50 για πλήρες και light κασέρι

	TL	NL	PL
ΠΛΗΡΕΣ	4,2x10 ⁻⁴ γρ	5,1x10 ⁻⁴ γρ	2,6x10 ⁻⁴ γρ
LIGHT	4,2x10 ⁻⁴ γρ	4,14x10 ⁻⁴ γρ	4,8x10 ⁻⁴ γρ

Πίνακας 4α: Αποτελέσματα βιολογικού πειράματος για το κασέρι

	Συσώρευση αιμοπεταλίων από το δείγμα	Αλλαγή σχήματος	Καμία αλλαγή στον PAF	Αναστολή του PAF/ IC50	Ευόδωση του PAF
4αTL (0,005γρ): 5λ	—	+	—	—	+
20λ	+	(0,6εκ)	—	—	+
50λ	—	+	—	+	(60%)
				IC50=4,2x10 ⁻⁴ γρ	
4αPL :25λ	—	—	+	—	—
50λ	—	+	—	+	(58%)
75λ	—	+			
				IC50=2,6x10 ⁻⁴ gr	
4αNL : 50λ	—	—	—	+	(13%)
75λ	—	—	—	+	(40%)
				IC50= 5,1x10 ⁻⁴ gr	
4βTL (0,005γρ): 5λ	—	+	—	—	+
20λ	—	+	—	—	+
50λ	—	+	—	+	(60%)
				IC50=4,2x10 ⁻⁴ gr	
4βPL :50λ	—	—	+	—	—
80λ	—	+	—	+	(49%)
				IC50=4,8x10 ⁻⁴ gr	
100λ	—	—			
4βNL : 50λ	—	—	+	—	—
70λ	—	—	—	+	(64%)
				IC50=4,14x10 ⁻⁴ gr	

Αποτελέσματα και συμπεράσματα για το κασέρι: Τα αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για το κασέρι φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 4α και στον πίνακα 4β. Στα λιποειδή του κασεριού φαίνεται ότι υπάρχουν αγωνιστές που προκαλούν αλλαγή σχήματος ή μικρής ισχύς συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ευόδωση της δράσης του PAF και εμφανίζονται στις μικρές ποσότητες χορήγησης των ολικών κυρίως λιποειδών και αναστολείς του PAF που ανιχνεύονται σε μεγαλύτερες ποσότητες χορήγησης των ολικών, πολικών και ουδέτερων λιποειδών.

Από τη σύγκριση των **ολικών λιποειδών** του πλήρους και light προϊόντος δε φαίνεται να υπάρχει καμία διαφορά ως προς τη βιολογική τους δραστηριότητα, παρά μόνο ότι τα 20λ του πλήρους προϊόντος προκαλούν μικρού ύψους συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ενώ του light αλλαγή σχήματος, που όμως υποδεικνύει τάση για συσσώρευση.

Στα **πολικά λιποειδή**, το IC50 για το light τρόφιμο είναι λίγο μεγαλύτερο από το αντίστοιχο του πλήρους, αν και η διαφορά δεν είναι αξιοσημείωτη. Αντίθετα στα **ουδέτερα λιποειδή** το IC50 του light είναι μικρότερο από αυτό του πλήρους, αλλά και πάλι η διαφορά δεν είναι σημαντική (Πίνακας 4β).

Από τη συνολική μελέτη αυτών των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η επεξεργασία που υφίσταται το light κασέρι δεν επηρεάζει αρνητικά ή θετικά τη βιολογική δραστηριότητα των λιποειδών του ως προς την επίδρασή τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την δράση του PAF.

5. ZAMPION

ZAMPION ΠΛΗΡΕΣ

5αTL- Ολικά λιποειδή από πλήρες ζαμπόν: Τα **50λ** προκάλεσαν συσσώρευση στα αιμοπετάλια με καμπύλη συσσώρευσης ύψους 8,7cm. Τα **10λ** προκάλεσαν συσσώρευση στα αιμοπετάλια με καμπύλη συσσώρευσης ύψους 5,8cm και μετά την προσθήκη του PAF παρατηρήθηκε απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα **2λ** προκάλεσαν συσσώρευση των αιμοπεταλίων με καμπύλη συσσώρευσης ύψους 2,7cm και μετά την προσθήκη PAF παρατηρήθηκε απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων ως προς τον PAF κατά 41% (4,1-2,4/4,1x 100). Με προσθήκη ποσότητας ίση με **0,2 λ**, του αρχικού διαλύματος μετά από αραίωση του διαλύματος σε BSA 1/10 και παραλαβή 20λ από το νέο διάλυμα, παρατηρήθηκε ευόδωση της δράσης του PAF (4,1cm/ 5,5cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Άρα τα

ολικά λιποειδή του πλήρους ζαμπόν περιέχουν κυρίως αγωνιστές του PAF και γι' αυτό υπολογίζεται και το EC50. Σαν 100% συσσώρευση θεωρείται ότι δίνουν τα 50λ με καμπύλη ύψους 8,7εκ (τελευταία αντιστρεπτή) οπότε τα 10λ προκαλούν 66,7% συσσώρευση ($5,8/8,7 \times 100$) και τα 2λ προκαλούν 31% συσσώρευση ($2,7/8,7 \times 100$). Με αυτά τα δύο σημεία σχηματίζεται ευθεία και υπολογίζεται ότι το EC50~ $6\lambda \Rightarrow 6\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = 3,6 \times 10^{-5}\gamma\rho$.

5αPL-Πολικά λιποειδή από πλήρες ζαμπόν: Τα 50λ προκάλεσαν συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ύψος καμπύλης 0,3 cm και πλήρη αναστολή του PAF. Τα 25λ προκάλεσαν αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και πλήρη αναστολή του PAF. Τα 75λ είχαν το ίδιο αποτέλεσμα ως προς την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων με τα 25λ. Τα 5λ προκάλεσαν αναστολή της δράσης του PAF 60% ($4,5-1,8/4,5 \times 100$). Τα 2 λ προκάλεσαν αναστολή της δράσης του PAF κατά 15% ($4,5-3,8/4,5 \times 100$). Και οι δύο αυτές ποσότητες προκάλεσαν αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων. Το IC50 υπολογίζεται με βάση τις τιμές αναστολής 15 και 60% οπότε προκύπτει $\sim 4,4\lambda \Rightarrow 4,4\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = 2,64 \times 10^{-5}\gamma\rho$

5α NL-Ουδέτερα λιποειδή από πλήρες ζαμπόν: Τα 50λ προκαλούν διαφορετικής μορφής συσσώρευση από εκείνη του PAF, συγκεκριμένα διφασική συσσώρευση, όπου το πρώτο κύμα είναι αντιστρεπτό με ύψος καμπύλης 0,3εκ και το δεύτερο κύμα είναι μη αντιστρεπτό με ύψος 5,8εκ. Τα 10λ δεν προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλλά ευοδώνουν τη δράση του PAF (4,1cm/ 6,7cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Ομοίως συμβαίνει και με τα 2λ (4,1cm/9,4cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Τα 35 και 41 λ προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων ίδιου τύπου με τα 50λ αλλά λιγότερο έντονες με ύψη 0,2cm και 1cm για τα δύο κύματα.

ZAMPION LIGHT

5βTL-Ολικά λιποειδή από ζαμπόν light: Τα 50λ προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων με καμπύλη συσσώρευσης ύψους 4,2cm. Τα 10λ προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων με καμπύλη ύψους 9,7cm και τα 2 λ προκαλούν συσσώρευση με καμπύλη ύψους 10,5cm. Φαίνεται ότι στο light ζαμπόν συνυπάρχουν αναστολείς και συσσωρευτές, αφού παρατηρείται εντονότερη συσσώρευση όσο μειώνουμε την ποσότητα των λιποειδών. Προσπαθώντας να ανιχνεύσουμε αυτή την αναστολή και επειδή δεν είχε νόημα να ανέβουμε σε μεγαλύτερες ποσότητες από τα 50λ , αραιώσαμε το αρχικό δείγμα σε BSA 1/100 φορές . Τα 2λ του νέου διαλύματος

ή τα **0,02λ** του αρχικού δεν επηρέασαν τη δράση του PAF (4,1cm/ 4,9cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Τα 20λ του νέου διαλύματος ή τα **0,2λ** του αρχικού προκάλεσαν αναστολή της δράσης του PAF κατά 32% (4,1-2,8/4,1x100). Τα 75λ του νέου διαλύματος ή τα **0,75λ** του αρχικού προκάλεσαν αναστολή της συσώρευσης κατά 44% (4,1-2,3/4,1x100). Με βάση τα δύο αυτά σημεία υπολογίζεται το IC50 οπότε προκύπτει $\sim 1,1\lambda \Rightarrow 1,1\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = 6,6 \times 10^{-6}\gamma\rho$.

5βPL-Πολικά λιποειδή από light ζαμπόν: Τα **50λ** προκαλούν μη αντιστρεπτή συσώρευση των αιμοπεταλίων μικρού ύψους (0,7εκ) και αναστέλλουν πλήρως τον PAF. Τα **5λ** προκαλούν αντιστρεπτή συσώρευση των αιμοπεταλίων με ύψος καμπύλης 6cm και προκαλούν απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα **2λ** προκαλούν αντιστρεπτή συσώρευση με ύψος καμπύλης 4,1cm και προκαλούν απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων. Τέλος μετά από αραίωση του διαλύματος 1/20 παίρνω 2λ νέου διαλύματος ή **0,1λ** του αρχικού οπότε προκαλείται ευόδωση της δράσης του PAF (4,1cm/12,4cm: ύψος καμπύλης πριν και μετά την προσθήκη αντίστοιχα). Αυτό πιθανά να σημαίνει ότι δεν υπάρχουν ισχυροί αναστολείς στα πολικά λιποειδή του light ζαμπόν ή δεν καταφέραμε να τους ανιχνεύσουμε λόγω της πολύ μικρής ποσότητας δείγματος στην τελευταία δοκιμή. Η επίμονη συσώρευση των αιμοπεταλίων, η ταυτόχρονη απευαισθητοποίηση των υποδοχέων του PAF και η ευόδωσή του όταν μειώνουμε την ποσότητα του δείγματος συνηγορούν στην ύπαρξη ισχυρών συσσωρευτών στα πολικά λιποειδή του light ζαμπόν.

5βNL-Ουδέτερα λιποειδή από light ζαμπόν: Τα **50λ** προκαλούν αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή της δράσης του PAF κατά 60% (4,5-1,8/4,5x100). Τα **25λ** προκαλούν αναστολή του PAF κατά 22% (4,5-3,5/4,5x100). Τα **65λ** προκαλούν μικρή αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή της δράσης του PAF κατά 31% (4,5-3,1/4,5x100). Τα **75λ** προκαλούν μικρή αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστολή του PAF κατά 69% (4,5-1,4/4,5 x100). Παρατηρούμε ότι τα **65λ** προκαλούν αναστολή του PAF που δεν ταιριάζει με τις υπόλοιπες τρεις σε σχέση με την ποσότητα του δείγματος και γι' αυτό πρόκειται για πειραματικό λάθος οπότε και την αγνοούμε. Για τον υπολογισμό του IC50 λαμβάνουμε υπόψη τις άλλες τρεις τιμές, οπότε προκύπτει $IC_{50} \sim 52\lambda \Rightarrow 52\lambda \times 0,003\gamma\rho / 500\lambda = 3,12 \times 10^{-4}\gamma\rho$.

Πίνακας 5α: Αποτελέσματα βιολογικού πειράματος για το ζαμπόν

	Συσώρευση αιμοπεταλίων από το δείγμα	Αλλαγή σχήματος	Καμία αλλαγή στον PAF	Αναστολή του PAF/ IC50	Ευόδωση του PAF	Απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων
5αTL 0,2λ	—	—	—	—	+(5,5/4,1εκ.)	—
2λ	+(2,7εκ =31%) EC50=3,6x10 ⁻⁵ gr	—	—	—	—	+
10λ	+(5,8εκ =66,6%)	—	—	—	—	+
50λ	+(8,7εκ =100%)	—	—	—	—	—
5αPL: 2λ	—	+	—	+(15%)	—	—
5λ	—	+	—	+(60%)	—	—
25λ	—	+	—	+(100%)	—	—
50λ	+(0,3εκ)	—	—	+(100%)	—	—
75λ	—	+	—	—	—	—
				IC50=2,64x10 ⁻⁵ gr	—	—
5αNL: 2λ	—	—	—	—	+(4,1/9,4εκ)	—
10λ	—	—	—	—	+(4,1/6,7εκ)	—
35λ	+διφασική (0,2/1εκ)	—	—	—	—	—
41λ	+διφασική (0,2/1εκ)	—	—	—	—	—
50λ	+διφασική (0,3/5,8εκ)	—	—	—	—	—
5βTL:						

0,02	–	–	+	–	–	–
0,2λ	–	–	–	+(32%)	–	–
0,75λ	–	+	–	+(44%)	–	–
2λ	+(10,5εκ)	–				
10λ	+(9,7εκ)	–				
50λ	+(4,2εκ)					
				IC50=6,6x10 ⁻⁶ gr		
5βPL: 0,1λ	–	–	–	–	+(12,4/4,1εκ)	–
2λ	+(4,1εκ)	–	–	–	–	+
5λ	+(6εκ)	–	–	–	–	+
50λ	+(0,7εκ) μη αντιστρεπτή	–	–	+(100%)	–	–
5βNL: 25λ	–	–	–	+(22%)	–	–
50λ	–	+	–	+(60%)	–	–
65λ	–	+	–	+(31%)	–	–
75λ	–	+	–	+(69%)	–	–
				IC50=3,12x10 ⁻⁴ γρ		

Πίνακας 5β :IC50 για πλήρες και light ζαμπόν

	TL	NL	PL
ΠΑΗΡΕΣ	-	-	2,64x10 ⁻⁵ γρ
LIGHT	6,6x10 ⁻⁶ γρ	3,12x10 ⁻⁴ γρ	-

Αποτελέσματα και συμπεράσματα για το ζαμπόν: Τα αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος για το ζαμπόν φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 5α και στον πίνακα 5β. Το πλήρες ζαμπόν εμφανίζει διαφορετική επίδραση στα αιμοπετάλια και στη δράση του PAF σε σχέση με το light τόσο σε επίπεδο ολικών λιποειδών, όσο και σε επίπεδο πολικών και ουδέτερων λιποειδών.

Στο πλήρες τρόφιμο φαίνεται ότι επικρατούν οι αγωνιστές στα **ολικά λιποειδή**, αφού προκαλείται ισχυρή συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το δείγμα με $EC_{50}=3,6 \times 10^{-5} \text{gr}$, ευόδωση της δράσης του PAF σε μικρές συγκεντρώσεις (0,2λ) και απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων σε υψηλότερες (2λ, 10λ).

Οι αγωνιστές του πλήρους τροφίμου εντοπίζονται κυρίως στα **ουδέτερα λιποειδή**, τα οποία προκαλούν διφασική συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ισχυρή ευόδωση της δράσης του PAF.

Αντίθετα στα **πολικά λιποειδή** του πλήρους τροφίμου ανιχνεύονται κυρίως αναστολείς της δράσης του PAF και σταθερή αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων από τα πολικά λιποειδή. Φαίνεται ότι στο πλήρες ζαμπόν και ιδιαίτερα στα ουδέτερα λιποειδή του, επικρατούν αγωνιστές, που ευοδώνουν τη δράση του PAF και υποβαθμίζουν την αξία του τροφίμου ως προς τη βιολογική δράση των λιποειδών του. Στο light ζαμπόν τα **ολικά λιποειδή** αναστέλλουν τη δράση του PAF σε μικρές συγκεντρώσεις (0,2λ, 0,75λ) με χαμηλό $IC_{50}= 6,6 \times 10^{-6} \text{gr}$, ενώ προκαλούν ισχυρή συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών λιποειδών στην κυψελίδα, υποδεικνύοντας την παρουσία αναστολέων. Είναι φανερό λοιπόν η συνύπαρξη αναστολέων και αγωνιστών στα ολικά λιποειδή του light ζαμπόν, σε αντίθεση με τα ολικά λιποειδή του πλήρους ζαμπόν όπου κυριαρχούν αγωνιστές.

Στα **πολικά λιποειδή** του light ζαμπόν επικρατούν αγωνιστές που προκαλούν σημαντική συσσώρευση των αιμοπεταλίων και απευαισθητοποίησή τους ως προς τη δράση του PAF σε χαμηλές συγκεντρώσεις (2λ, 5λ) και 100% αναστολή της δράσης του σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (50λ). Σε αντίθεση με τα πολικά λιποειδή του πλήρους τροφίμου, όπου επικρατούν αναστολείς, στα πολικά λιποειδή του light τροφίμου επικρατούν αγωνιστές οι οποίοι πιθανά να δρουν μέσω των υποδοχέων του PAF, προκαλώντας απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις και αναστολή της δράσης του σε υψηλότερες.

Στα **ουδέτερα λιποειδή** του light ζαμπόν επικρατούν αναστολείς της δράσης του PAF με $IC_{50}=3,12 \times 10^{-4}$ γρ, ενώ παρατηρείται και αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων. Αντίθετα στα ουδέτερα λιποειδή του πλήρους τροφίμου επικρατούν αγωνιστές που προκαλούν διφασική συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ευοδώνουν τη δράση του PAF.

Από τη σύγκριση των δύο τροφίμων φαίνεται ότι εμφανίζουν τελείως διαφορετική συμπεριφορά ως προς τη βιολογική δραστικότητα των λιποειδών τους. Στα **ολικά λιποειδή** του πλήρους τροφίμου επικρατούν ισχυροί αγωνιστές, ενώ στα ολικά λιποειδή του light τροφίμου ανιχνεύονται αναστολείς και αγωνιστές. Στα **πολικά λιποειδή** του πλήρους τροφίμου παρουσιάζεται εντονότερη η δράση αναστολέων, ενώ στα πολικά λιποειδή του light επικρατούν αγωνιστές. Το αντίστροφο συμβαίνει με τα **ουδέτερα λιποειδή** που στο πλήρες τρόφιμο επικρατούν αγωνιστές που προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ευόδωση της δράσης του PAF, ενώ στο light τρόφιμο επικρατούν αναστολείς. Η τελείως διαφορετική δραστικότητα των ολικών, πολικών και ουδέτερων λιποειδών των δύο τροφίμων πιθανά να οφείλεται στην επεξεργασία που υφίσταται το ζαμπόν, αλλά και στη διαφορετική προέλευση της πρώτης ύλης, δηλαδή στην επιλογή άλλου τμήματος του ζώου για την παρασκευή του πλήρους και light ζαμπόν, οπότε αλλάζει η ποσότητα και η ποιότητα των ολικών λιποειδών και των κλασμάτων τους. Πάντως δεν είναι σαφές αν προκαλείται υποβάθμιση ή όχι του τροφίμου, αφού στα ολικά λιποειδή του light τροφίμου εμφανίζεται και η δράση αναστολέων του PAF, όπως συμβαίνει και με τα ουδέτερα, που αποτελούν το σημαντικότερο κλάσμα των ολικών λιποειδών, ενώ στο πλήρες τρόφιμο επικρατούν αγωνιστές, που κατά κύριο λόγο ευοδώνουν τη δράση του PAF. Βέβαια, είναι πιθανό οι αγωνιστές του πλήρους τροφίμου να δρουν μέσω των υποδοχέων του PAF, οπότε και προκαλούν απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων ως προς τη δράση του PAF. Σε αυτή την περίπτωση η απουσία τους στο light τρόφιμο δεν είναι ωφέλιμη για τη βιολογική δραστικότητα των ολικών λιποειδών του light τροφίμου. Σίγουρο είναι ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στη βιολογική δραστικότητα των λιποειδών του πλήρους και light τροφίμου, που δικαιολογεί περαιτέρω διερεύνηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kinsella JE, Lokesh B, Stone RA. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. Am J Clin Nutr 1990;52:1-28.
2. Calder PC. Bioactive lipids in foods. Biochem Soc Trans 1996;24:814-24.
3. Grimble RF. Dietary lipids and the inflammatory response. Proc Nutr Soc 1998;57:535-42.
4. Watanabe S, Doshi M, Akimoto K, Kiso Y, Hamazaki T. Suppression of platelet-activating factor generation and modulation of arachidonate metabolism by dietary enrichment with (n-9) eicosatrienoic acid or docosahexaenoic acid in mouse peritoneal cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2001;66:109-20.
5. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in the prevention-management of cardiovascular disease. Can J Physiol Pharmacol 1997;75:234-9.
6. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. Am J Clin Nutr 1997;65:1645S-1654S.
7. Knapp HR. Dietary fatty acids in human thrombosis and hemostasis. Am J Clin Nutr 1997;65:1687S-1698S.
8. Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. Physiol Rev 2000;80:1669-99.
9. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. Annu Rev Biochem 2000;69:419-45.
10. Feuerstein G, Rabinovici R, Leor J, Winkler JD, Vonhof S. Platelet-activating factor and cardiac diseases: therapeutic potential for PAF inhibitors. J Lipid Mediat Cell Signal 1997;15:255-84.
11. Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. Prog Lipid Res 2000;39:41-82.
12. Marathe GK, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oxidized LDL contains inflammatory PAF-like phospholipids. Trends Cardiovasc Med 2001;11:139-42.

13. Marathe GK, Harrison KA, Murphy RC, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Bioactive phospholipid oxidation products. Free Radic Biol Med 2000;28:1762-70.
14. Stewart AG, Dubbin PN, Harris T, Dusting GJ. Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of icosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:3215-9.
15. Sugiura T, Tokumura A, Gregory L, Nouchi T, Weintraub ST, Hanahan DJ. Biochemical characterization of the interaction of lipid phosphoric acids with human platelets: comparison with platelet activating factor. Arch Biochem Biophys 1994;311:358-68.
16. Peplow PV. Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1999;61:65-82.
17. Poeze M, Froon AH, Ramsay G, Buurman WA, Greve JW. Decreased organ failure in patients with severe SIRS and septic shock treated with the platelet-activating factor antagonist TCV-309: a prospective, multicenter, double-blind, randomized phase II trial. TCV- 309 Septic Shock Study Group. Shock 2000;14:421-8.
18. Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, et al. Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. Gut 2001;48:62-9.
19. Imrie CW, McKay CJ. The possible role of platelet-activating factor antagonist therapy in the management of severe acute pancreatitis. Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol 1999;13:357-64.
20. Lane JS, Todd KE, Gloor B, et al. Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis. J Surg Res 2001;99:365-70.
21. Hayashi J, Hiromura K, Koizumi R, et al. Platelet-activating factor antagonist, SM-12502, attenuates experimental glomerular thrombosis in rats. Nephron 2001;87:274-8.

22. Souza DG, Cara DC, Cassali GD, et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. Br J Pharmacol 2000;131:1800-8.
23. Yamaguchi S, Tomomatsu N, Komatsu H. Effect of Y-24180, a receptor antagonist to platelet-activating factor (PAF), on allergic cutaneous reactions in actively sensitized mice. Inflamm Res 2000;49:584-90.
24. Todoroki H, Higure A, Okamoto K, et al. Possible role of platelet-activating factor in the in vivo expression of tissue factor in neutrophils. J Surg Res 1998;80:149-55.
25. Kawaguchi A, Sugimoto K, Fujimura A. Preventive effect of platelet-activating factor antagonist, Y-24180, against cyclosporine-induced acute nephrotoxicity. Life Sci 2001;68:1181-90.
26. Taggart DP. Effects of a platelet-activating factor antagonist on lung injury and ventilation after cardiac operation. Ann Thorac Surg 2001;71:238-42.
27. Taylor R, Fatovich D, Hitchcock T, Morrison C, Curtis L. Platelet-activating factor antagonism and streptokinase-induced hypotension in clinical acute myocardial infarction. Clin Sci (Lond) 2001;100:601-7.
28. Persidsky Y, Limoges J, Rasmussen J, Zheng J, Gearing A, Gendelman HE. Reduction in glial immunity and neuropathology by a PAF antagonist and an MMP and TNFalpha inhibitor in SCID mice with HIV-1 encephalitis. J Neuroimmunol 2001;114:57-68.
29. Martin M, Serradi N, Dereuddre-Bosquet N, et al. PMS-601, a new platelet-activating factor receptor antagonist that inhibits human immunodeficiency virus replication and potentiates zidovudine activity in macrophages. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3150-4.
30. Fraga AG, Rodrigues CR, de Miranda AL, Barreiro EJ, Fraga CA. Synthesis and pharmacological evaluation of novel heterotricyclic acylhydrazone derivatives, designed as PAF antagonists. Eur J Pharm Sci 2000;11:285-90.
31. Fujita M, Seki T, Inada H, Shimizu K, Takahama A, Sano T. Approach to dual-acting platelet activating factor (PAF) receptor

- antagonist/thromboxane synthase inhibitor (TxSI) based on the link of PAF antagonists and TxSIs. Bioorg Med Chem Lett 2002;12:341-4.
32. Logani S, Chen MC, Tran T, Le T, Raffa RB. Actions of Ginkgo Biloba related to potential utility for the treatment of conditions involving cerebral hypoxia. Life Sci 2000;67:1389-96.
 33. Wittwer T, Grote M, Oppelt P, Franke U, Schaefer HJ, Wahlers T. Impact of PAF antagonist BN 52021 (Ginkgolide B) on post-ischemic graft function in clinical lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2001;20:358-63.
 34. Thomet OA, Wiesmann UN, Schapowal A, Bizer C, Simon H. Role of petasin in the potential anti-inflammatory activity of a plant extract of petasites hybridus. Biochem Pharmacol 2001;61:1041-7.
 35. Jantan I, Juriyati J, Warif NA. Inhibitory effects of xanthenes on platelet activating factor receptor binding in vitro. J Ethnopharmacol 2001;75:287-90.
 36. Liao CH, Ko FN, Wu CL, Teng CM. Antiplatelet effect of marchantinquinone, isolated from Reboulia hemisphaerica, in rabbit washed platelets. J Pharm Pharmacol 2000;52:353-9.
 37. Jantan I, Rafi IA, Jalil J. Inhibition of platelet-activating factor receptor binding by aporphine and phenanthrenoid alkaloids from Aromadendron elegans. Planta Med 2001;67:466-7.
 38. Han BH, Yang HO, Kang YH, et al. In vitro platelet-activating factor receptor binding inhibitory activity of pinusolide derivatives: a structure-activity study. J Med Chem 1998;41:2626-30.
 39. Rigat B, Reynaud D, Smiljanic-Georgijev N, Mahuran D. The GM2 activator protein, a novel inhibitor of platelet-activating factor. Biochem Biophys Res Commun 1999;258:256-9.
 40. Lekka M, Tokumura A, Tsuji H, Hanahan DJ. Isolation of a phospholipid inhibitor of platelet activating factor- induced activity from perfused rat liver: identification as phosphatidylglycerol. Arch Biochem Biophys 1993;302:380-4.
 41. Koussissis S. PAF antagonists in foods: Isolation and identification of PAF antagonists in virgin olive oil. Rev. Fr. Crops Gras 1993;40:323-329.

42. Karantonis HC, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others. J Agric Food Chem 2002;50:1150-60.
43. Renaud S, de Lorgeril M, Delaye J, et al. Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. Am J Clin Nutr 1995;61:1360S-1367S.
44. Fragopoulou E, Nomikos T, Antonopoulou S, Mitsopoulou CA, Demopoulos CA. Separation of biologically active lipids from red wine. J Agric Food Chem 2000;48:1234-8.
45. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must. J Agric Food Chem 2002;50:2684-94.
46. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet 1992;339:1523-6.
47. Antonopoulou S. Platelet-Activating Factor (PAF) Antagonists in foods: A study of Lipids with PAF or Anti-PAF-like Activity in Cow's milk and Yogurt. J Agric Food Chem 1996;44:3047-3051.
48. Koussissis S. PAF antagonists in foods: Isolation and identification of PAF antagonists in honey and wax. Ibid 1994:127-132.
49. Rementzis J, Antonopoulou S, Argyropoulos D, Demopoulos CA. Biologically active lipids from *S. scombrus*. Adv Exp Med Biol 1996;416:65-72.
50. Panaviotou A, Samartzis D, Nomikos T, et al. Lipid fractions with aggregatory and antiaggregatory activity toward platelets in fresh and fried cod (*Gadus morhua*): correlation with platelet-activating factor and atherogenesis. J Agric Food Chem 2000;48:6372-9.
51. Ahmed AA, Holub BJ. Alteration and recovery of bleeding times, platelet aggregation and fatty acid composition of individual phospholipids in platelets of human subjects receiving a supplement of cod-liver oil. Lipids 1984;19:617-24.
52. Bellisle F, Altenburg de Assis MA, Fieux B, et al. Use of 'light' foods and drinks in French adults: biological, anthropometric and nutritional correlates. J Hum Nutr Diet 2001;14:191-206.

53. Sandrou DK, Arvanitoyannis IS. Low-fat/calorie foods: current state and perspectives. Crit Rev Food Sci Nutr 2000;40:427-47.
54. Gatenby SJ, Aaron JJ, Jack VA, Mela DJ. Extended use of foods modified in fat and sugar content: nutritional implications in a free-living female population. Am J Clin Nutr 1997;65:1867-73.
55. Rodriguez LM, Castellanos VM. Use of low-fat foods by people with diabetes decreases fat, saturated fat, and cholesterol intakes. J Am Diet Assoc 2000;100:531-6.
56. Harper S, Rutishauser IH. What do users of reduced-fat dairy products know about the fat in their diets? Public Health Nutr 2001;4:227-32.
57. Hill JO, Seagle HM, Johnson SL, et al. Effects of 14 d of covert substitution of olestra for conventional fat on spontaneous food intake. Am J Clin Nutr 1998;67:1178-85.
58. Stubbs RJ. The effect of ingesting olestra-based foods on feeding behavior and energy balance in humans. Crit Rev Food Sci Nutr 2001;41:363-86.
59. Kennedy E, Bowman S. Assessment of the effect of fat-modified foods on diet quality in adults, 19 to 50 years, using data from the Continuing Survey of Food Intake by Individuals. J Am Diet Assoc 2001;101:455-60.
60. Velthuis-te Wierik EJ, van den Berg H, Weststrate JA, van het Hof KH, de Graaf C. Consumption of reduced-fat products: effects on parameters of anti-oxidative capacity. Eur J Clin Nutr 1996;50:214-9.
61. Astrup A. The American paradox: the role of energy-dense fat-reduced food in the increasing prevalence of obesity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 1998;1:573-7.
62. Rolls BJ, Miller DL. Is the low-fat message giving people a license to eat more? J Am Coll Nutr 1997;16:535-43.
63. Kaushik S, Wander R, Leonard S, German B, Traber MG. Removal of fat from cow's milk decreases the vitamin E contents of the resulting dairy products. Lipids 2001;36:73-8.
64. Dennison BA, Rockwell HL, Nichols MJ. Use of low-fat milk by children in the New York State WIC varies with parental characteristics. J Am Diet Assoc 2001;101:464-6.
65. Maijala H, Munnukka T, Nikkonen M. Feeling of 'lacking' as the core of envy: a conceptual analysis of envy. J Adv Nurs 2000;31:1342-50.

- 66. Berner LA. Roundtable discussion on milkfat, dairy foods, and coronary heart disease risk. J Nutr 1993;123:1175-84.**